

**Karaburun Yarımadasında Yetişen 'Hurma' Zeytininin Bazı Kimyasal
ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Karakterizasyonu**

Proje No: 1100780

Doç.Dr. F. Banu ÖZEN
Yrd. Doç. Dr. Handan BAYSAL
Doç. Dr. Figen TOKATLI

EKİM 2013
İZMİR

ÖNSÖZ

Zeytinin olgunlaşma sırasında dalında tatlılaşması İzmir'in Karaburun yarımadasının baskın zeytin tipi olan Erkence'de görülmekte olan bir durumdur. Acılığını kaybeden bu zeytinler Hurma zeytin olarak bilinmektedir. Benzer durumlara Tunus ve Yunanistan'ın belirli bölgelerinde yetişen zeytinlerde de rastlanmıştır. Bugüne kadar Hurma zeytin üzerinde kısıtlı sayıda çalışma yapılmıştır. Tübitak tarafından desteklenen bu proje (Tübitak TOVAG 1100780) ile Hurma zeytinin acılığını yitirme sürecini aydınlatmak amacı ile bu zeytinin, hurmalaşmamış Erkence ve Gemlik tipi zeytinlerle karşılaştırmalı olarak kimyasal ve mikrobiyolojik karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda iki yüksek lisans tezi tamamlanmış, konu üzerinde şu ana kadar bir bilimsel makale kabul edilmiş ve ulusal veya uluslararası çeşitli konferanslarda dokuz bildiri sunulmuştur.

Bu projeye örnek sağlanmasında yardımcı olan Karaburun ilçesi Eğlenhoca köyü sakinlerine, kimyasal ve mikrobiyolojik analizlerde destek sağlayan İYTE BİYOMER ve Çevre Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezine ve maddi destek sağlayan Tübitak'a teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar.....	iv
ŞEKİLLER.....	vi
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Hurma Zeytini	2
2.2. Zeytinin Kimyasal Karakterizasyonu.....	3
2.3. Zeytinin Mikrobiyolojik Karakterizasyonu.....	4
2.4. Mikroorganizmaların Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması	6
2.4.1. Laktik Asit Bakterileri ve Mayaların Moleküler Yöntemle Tanımlanması.....	6
2.4.2. Phoma Suşlarının Moleküler Yöntemle Tanımlanması	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	7
3.1. Örnekleme	7
3.2. Kimyasal Analizler	8
3.2.1. Olgunlaşma İndisi.....	8
3.2.2. Rutin Analizler.....	8
3.2.3. Şeker Tayini	8
3.2.4. Organik Asit Tayini	8
3.2.5. Toplam Fenol İçeriği.....	9
3.2.6. Fenol Profili	9
3.2.7. Yağ Asidi Profili	10
3.3. Mikrobiyolojik Analizler	10
3.3.1. Hava Örnekleme	10
3.3.2. Mikroorganizma Sayımları	11
3.3.3. İzolasyon ve İzolatların Saklanması.....	11
3.3.4. Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Morfolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Testler	12
3.3.5. Küflerin Tanımlanmasında Kullanılan Morfolojik ve Moleküler Testler.....	13
3.3.6. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Morfolojik ve Moleküler Testler	16
3.4. İstatistiksel Analizler	17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	18
4.1. Kimyasal Karakterizasyon	18
4.1.1. Zeytinlerin Şeker İçerikleri	22

4.1.2.	Zeytinlerin Organik Asit İçerikleri	27
4.1.3.	Zeytinlerin Toplam Fenol İçerikleri.....	32
4.1.4.	Zeytinlerin Fenol Profilleri.....	35
4.1.5.	Zeytinlerin Yağ İçerikleri.....	40
4.1.6.	Zeytinlerin Yağ Asidi Profilleri.....	41
4.1.7.	Değişik Parametrelerin Kombinasyonu.....	51
4.2.	Mikrobiyolojik Karakterizasyon	53
4.2.1.	Mikrobiyolojik Sayım Sonuçları.....	53
4.2.2.	Bakteri İzolatlarının Tanımlanması	62
4.2.3.	Küf İzolatlarının Tanımlanması.....	68
4.2.4.	<i>Phoma</i> Suşlarının Moleküler Yöntemle Tanımlanması	78
4.2.5.	Maya İzolatlarının Tanımlanması	83
4.3.	Kimyasal ve Mikrobiyolojik Veriler Arasındaki Bağlantılar.....	95
5.	SONUÇLAR	101
6.	PROJE ÇIKTILARI	103
	KAYNAKLAR.....	104

TABLolar

Tablo 1. HPLC analizinde kullanılan mobil fazların sıcaklıkla değişim programı.....	10
Tablo 2. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılında ve örnekleme sürecinde olgunlaşma indisleri.....	19
Tablo 3. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin pH verileri için ANOVA tablosu	21
Tablo 4. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin a_w verileri için ANOVA tablosu	21
Tablo 5. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde şeker profilleri (mg/kg).....	23
Tablo 6. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde organik asit profilleri (mg/kg)	29
Tablo 7. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde toplam fenol içeriği (mg/100 g) ve fenol profilleri (mg/kg)	33
Tablo 8. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin 2012/13 hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde toplam fenol içeriği (mg/100 g) ve fenol profilleri (mg/kg)	34
Tablo 9. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin toplam fenol içeriği verileri için ANOVA tablosu	35
Tablo 10. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde yağ içerikleri.....	41
Tablo 11. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde yağ asidi profilleri (%)	43
Tablo 12. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde yağ asidi profilleri (%)	44
Tablo 13. Hurma zeytinin mikrobiyolojik analiz (log CFU/g) sonuçları *	56
Tablo 14. Erkence zeytinin mikrobiyolojik analiz (log CFU/g) sonuçları*	57
Tablo 15. Gemlik zeytinin mikrobiyolojik analiz (log CFU/g) sonuçları*	58
Tablo 16. Hurma-Erkence zeytin bahçesinin hava örneklerinin mikrobiyolojik analiz (log CFU/m ³) sonuçları*.....	59
Tablo 17. Gemlik zeytin bahçesinin hava örneklerinin mikrobiyolojik analiz (log CFU/m ³) sonuçları*	59
Tablo 18. Erkence zeytin yapraklarının mikrobiyolojik analiz (log CFU/g)sonuçları*	60
Tablo 19. Gemlik zeytin yapraklarının mikrobiyolojik analiz (log CFU/g) sonuçları*	61
Tablo 20. 2011 ve 2012 hasat yıllarına ait olgunlaşma sürecinde Hurma ve Gemlik zeytinleri, yaprakları ve bahçelerindeki hava kaynaklı bakteri izolat sayıları	63
Tablo 21. 2011-2012 hasat yıllarında olgunlaşma sürecinde Hurma ve Erkence zeytinleri, yaprakları ve bahçelerindeki hava kaynaklı bakteri izolatlarının biyokimyasal ve moleküler tanımlama sonuçları	64

Tablo 22. 2011 ve 2012 hasat yıllarına ait olgunlaşma sürecinde örnekleme analiz zamanına bağlı olarak Hurma ve Gemlik zeytinleri, yaprakları ve bahçelerindeki hava kaynaklı küf izolat sayıları	70
Tablo 23. Moleküler tekniklerle tanımlanan 2011 ve 2012 hasat yıllarında olgunlaşma periyodu süresince Hurma zeytininden izole edilen fungal cins ve türler.....	75
Tablo 24. <i>Phoma</i> türlerinin tanımlanmasında kullanılan primerler	80
Tablo 25. Hurma zeytinden <i>Phoma</i> türlerine spesifik ITS ve ACT genlerinin kullanılması suretiyle metot 1'e göre gerçekleştirilen tanımlama sonuçları	82
Tablo 26. Hurma zeytinden <i>Phoma</i> türlerine spesifik ITS ve ACT genlerinin kullanılması suretiyle metot 2'ye göre gerçekleştirilen tanımlama sonuçları	83
Tablo 27. 2011 ve 2012 hasat yıllarına ait olgunlaşma sürecinde örnekleme analiz zamanına bağlı olarak Hurma ve Gemlik zeytinleri, yaprakları ve bahçelerindeki hava kaynaklı maya izolat sayıları	84
Tablo 28. 2011 yılı Erkence ve Gemlik zeytinlerinden, zeytin yapraklarından ve zeytin bahçelerinin hava örneklerinden maya izolatlarının kültürel, API ve moleküler yöntemlerle tanımlama sonuçlarının karşılaştırması	88
Tablo 29. 2012 yılı Erkence ve Gemlik zeytinlerinden, zeytin yapraklarından ve zeytin bahçelerinin hava örneklerinden maya izolatlarının kültürel, API ve moleküler yöntemlerle tanımlama sonuçlarının karşılaştırması	92

ŞEKİLLER

Şekil 1. Zeytin örnekleme lokasyonları (www.karayollari-haritasi.com).....	7
Şekil 2. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılında ve örnekleme sürecinde pH değerleri	20
Şekil 3. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılında ve örnekleme sürecinde a_w değerleri	20
Şekil 4. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde toplam şeker miktarları	24
Şekil 5. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait şeker profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri	25
Şekil 6. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait şeker profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin skor grafiği	26
Şekil 7. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait şeker profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri	27
Şekil 8. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde toplam şeker miktarları	28
Şekil 9. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait organik asit profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin skor grafiği	30
Şekil 10. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2012/13 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait organik asit profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin skor grafiği	30
Şekil 11. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait organik asit profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri	31
Şekil 12. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait fenol profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri	36
Şekil 13. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait fenol profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri	38
Şekil 14. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2012/13 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait fenol profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri	39
Şekil 15. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılında sekiz haftalık örnekleme sürecinde a) oleik asit/linoleik asit ve b) MUFA/PUFA oranları	45

Şekil 16. Bitkilerde yağ asidi sentezi ve desaturase enziminin sentezdeki fonksiyonu (www.sciendirect.com)	46
Şekil 17. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait yağ asidi profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri	47
Şekil 18. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait fenol profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri	49
Şekil 19. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2012/13 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait fenol profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri	50
Şekil 20. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait a) şeker + organik asit (3 asal bileşen, $R^2 = 0,64$, b) şeker+ yağ asidi (4 asal bileşen, $R^2 = 0,61$) ve c) şeker + organik asit + yağ asidi + fenol + toplam fenol verileri (3 asal bileşen, $R^2 = 0,41$) ile oluşturulan PCA modellerinin skor grafikleri.....	52
Şekil 21. 2011-2012 hasat yıllarında olgunlaşma sürecinde Hurma zeytinlerinin toplam canlı sayılarındaki değişim.....	54
Şekil 22. 2011-2012 hasat yıllarında olgunlaşma sürecinde Hurma zeytinlerinin maya ve küf sayılarındaki değişim (PDA besiyerinden elde edilen sayım sonuçları kullanımıştır).....	54
Şekil 23. 2011-2012 hasat yıllarında olgunlaşma sürecinde Hurma zeytinlerinin <i>Enterobacteriaceae</i> sayılarındaki değişim	55
Şekil 24. Hurma zeytin yaprağının SEM görüntüsü	65
Şekil 25. Bakteri izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Lane 1, molecular size marker 100 bp DNA ladder (Fermentas); lane 1, <i>Bacillus simplex</i> .; lane 2, <i>Bacillus simplex</i> ; lane 4, <i>Klebsiella oxytoca</i> ; lane 5, <i>Pantoea agglomerans</i> ; lane 6, <i>Klebsiella oxytoca</i> .; lane 9, <i>Micrococcus luteus</i> ; lane 10, <i>Bacillus sp.</i> ; lane 12, <i>Acinetobacter sp.</i> , lane 13, <i>Bacillus licheniformis</i> ; lane 17, <i>Arthrobacter sp.</i> lane 21, <i>Arthrobacter sp.</i> ; lane 22, <i>Pantoea sp.</i> ; lane 23, <i>Streptomyces sp.</i> ; lane 24, <i>Bacillus sp.</i> ; lane 26, <i>Pseudomonas sp.</i> .	67
Şekil 26. Hurma zeytin (A) ve Erkence zeytin (B) örneklerinden izole edilen bakterilerin % 2 (A) ve % 5 (B) farklılık gösteren 16S r DNA gen sekanslarına göre birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik (neighbor-joining) ağacı	68
Şekil 27. Küf izolatlarının besiyerlerinde 3 nokta ekim koloni üst ve alt yüzey görüntüleri	71
Şekil 28. Küf izolatlarının mikroskopik (hücre) morfolojik özelliklerinin sırasıyla stereomikroskopta ve ışık mikroskopunda inceleme sonuçları.....	74

Şekil 29. Farklı primerler (ITS, 18S, 26S) kullanıldığında izolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri. Y, yaprak örneği (direkt örnek), H, Hurma zeytin (direkt örnek), 56, maya izolatu, 54: maya izolatu, 9b: maya izolatu74

Şekil 30. Küf izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Lane 1 (Z1-SDA-2) *Aspergillus sydowii*; lane 2 (Z1-OA-10) *Penicillium paxilli*; lane 3 (2H3-PDA-30) Not identified; lane 4 (5H2-PDA-12) *Aspergillus fumigatus*; lane 5 (6H-PDA-37) *Uncultured Alternaria clone*; lane 6 (6H-PDA-2) *Fusarium fujikuroi*; lane 7 (6H1-CZA-4) *Fusarium sp.*; lane 8 (6H-PDA-43) *Aspergillus oryzae*; lane 9 (6H-PDA-41) *Penicillium sp.*; lane 10 (7H-OA-71) *Penicillium glabrum*; lane 11 (8H-PDA-7) *Penicillium sp.*; lane 12 (8H-SDA-12) *Paecilomyces variotii*; lane 13 (2.5H-SDA-13) *Penicillium glabrum*; lane 14 (2.5H-SDA-4) Not identified; lane 15 (2.5H-SDA-6) Not identified; lane 16 (2.7H-PDA-84) Not identified; lane 17 (3H-CZA-5) *Aspergillus japonicus*; lane 18 (8H-CZA-13) *Aspergillus ochraceus*; lane 19 (2.3H-PDA-19) *Aspergillus oryzae*; lane 20 (H1-PCA-2) *Aspergillus sydowii*; lane 21 (4H-OA-6) *Penicillium funiculosum*; lane 22 (8H2-PDA-24) *Penicillium expansum*; lane 23 (8H2-OA-21) *Aspergillus fumigatus*; lane 24 (H1-OA-4) *Diplodia pinea*; lane 25 (H1-PDA-7) *Penicillium sp.*; lane 26 (2.5H1-SDA-16) *Penicillium glabrum*; lane 27 (H1S2) *Aspergillus terreus*; lane 28 (8H5-SDA-11) *Aspergillus fumigatus*; lane 29 (H1-S2) *Aspergillus terreus*; lane 30 (Z1-OA-1) *Penicillium sp.*; lane 31 (H1-OA-5) *Magnaporthe grisea isolate*; lane 32 (H1-PCA-5) Not identified; lane 33 (H1-PDA-4) *Penicillium sp.*; lane 34 (2.1A-PDA-7) *Aspergillus terreus*; lane 35 (3A-PDA-4C) *Aspergillus fumigatus*; lane 36 (3A-PDA-1) *Penicillium sp.*; lane 37 (4A-PDA-7) *Aspergillus ustus*; lane 38 (4H3-PDA-31) Not identified; lane 39 (4H-PDA-1) *Alternaria tenuissima*; lane 40 (4A-PDA-11) *Emericella sp.*; lane 41 (4A-PDA-6) Not identified; lane 42 (4H3-SB-35) *Penicillium sp.*76

Şekil 31. Tanımlamada kullanılan besiyerlerinde 3 nokta ekim yapılmış küflerin koloni üst ve alt görünüşleri78

Şekil 32. Lane 1-16 ITS/VG9 Lane 17-32 ACTIN primerleri kullanılmıştır. Kodlar: 1 H1, 2 H2, 3 H3, 4 H4, 5 H5, 6 H6, 7 H7, 8 H8, 9 2H1, 10 2H2, 11 2H3, 12 2H4, 13 2H5, 14 2H6, 15 2H7, 16 2H8, 17 H1, 18 H2, 19 H3, 20 H4, 21 H5, 22 H6, 23 H7, 24 H8, 25 2H1, 26 2H2, 27 2H3, 28 2H4, 29 2H5, 30 2H6, 31 2H7, 32 2H8. Lane 1 (2H1) *Botryosphaeria dothidea*; lane 2 (2H2) *No identification*; lane 3 (2H6) *Hypoxyton vinosopulvinatum*; lane 4 (2H7) *Penicillium chrysogenum*; lane 5 (2H8) *Colletotrichum gloeosporioides*; lane 6 (H1) *Emericella gingxianii*; lane 7 (H2) *Emericella varicolor*; lane 8 (H6) *Hypoxyton erythrostroma*; lane 9 (2H1) *Penicillium sp.*; lane 10 (2H2) *Aspergillus japonicus*; lane 11 (2H6) *Penicillium sp.*; lane 12 (2H7) *Penicillium chrysogenum*; lane 13 (2H8) *Aspergillus varicolor*, *Emericella nidulans*; lane 14 (H1) *Aerobasidium proteae*, *Kabatiella microsticta*; lane 15 (H2) *Fusarium fujikuroi*, *Gibberella moniliformis*; lane 16 (H6) *Kabatiella microsticta*, *Aerobasidium proteae*81

Şekil 33 a ve b. 2011 yılı zeytin maya izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Lane 4-5: *Candida diddensiae*; Lane 6-7, 9, 9b2, 10, 21: *Debaryomyces hansenii*; Lane 11, 18, 22-30; 34-35, 36k, 37-39: *Metschnikowia viticola*; Lane 20: *Candida zeylanoides*; Lane 31-32, 40, 42, 49: *Aureobasidium pullulans*; Lane 33: *Metschnikowia pulcherrima*; Lane 41, 43a, 43k, 50, 53-56: *Rhodotorula mucilaginosa*; Lane 9b1, 19, 44-46, 48, 51-52: unidentified; GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. N: negatif kontrol86

Şekil 34 a ve 1b. 2012 yılı zeytin maya izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Lane 1-4, 6-11, 14-19, 22-25, 27-29, 31, 35-37, 39-40, 44-47, 50-55, 57-58, 60-61, 64-74, 77, 79-82; 84-85, 87, 91, 93, 95-99, 101-105, 108, 110-111, 114, 118, 121-124, 127, 130, 134, 138, 140, 143, 145-146: *Aureobasidium pullulans*; Lane 5, 12-13, 20-21, 26, 32, 56: *Fungal sp.*; Lane 30, 34, 38, 78: *Cryptococcus albidus*; Lane 42-43, 63: *Rhodotorula mucilaginosa*; Lane 48, 59: *Cryptococcus aerius*; Lane 62: *Sporidiobolus pararoseus*; Lane 75, 128, 144: *Candida pimensis*; Lane 76: *Mortierella indohii*; Lane 83, 112: *Sporidiobolus salmonicolor*; Lane 88: *Cryptococcus magnus*; Lane 89, 100: *Metschnikowia sp.*; Lane 90, 139: *Pseudozyma hubeiensis*; Lane 92: *Metschnikowia pulcherrima*; Lane 33, 41, 49, 86, 94, 106-107, 109, 113, 115-117, 119-120, 125-126, 129, 131-133, 135-137, 141-142: unidentified; GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. (a) Lane 1-76. (b) Lane 77-146. N: Negatif kontrol87

Şekil 35. 2011/12 toplam fenol miktarı verilerine karşı a) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı b) toplam maya ve küf sayısı; 2012/13 toplam fenol miktarı verilerine karşı c) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı d) toplam maya ve küf sayısı96

Şekil 36. İki hasat yılı oleuropein miktarı verilerine karşı toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı (a ve c) ile toplam maya ve küf sayısı (b ve d) ve iki hasat yılı hidrosityrosol miktarı verilerine karşı toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı (e ve g) ile toplam maya ve küf sayısı (f ve h)97

Şekil 37. İki hasat yılı apigenin miktarı verilerine karşı toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı (a ve c) ile toplam maya ve küf sayısı (b ve d) ve iki hasat yılı verbaskozit miktarı verilerine karşı toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı (e ve g) ile toplam maya ve küf sayısı (f ve h).....98

Şekil 38. 2011/12 toplam şeker miktarı verilerine karşı a) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı, b) toplam maya ve küf sayısı; 2012/13 toplam şeker miktarı verilerine karşı c) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı, d) toplam maya ve küf sayısı100

Şekil 39. 2011/12 toplam organik asit miktarı verilerine karşı a) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı, b) toplam maya ve küf sayısı; 2012/13 toplam organik asit miktarı verilerine karşı c) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı, d) toplam maya ve küf sayısı.....101

ÖZET

Özellikle Karaburun yarımadasında yetiştirilen Hurma zeytininin diğer zeytinlerden farklılığı olgunlaşma sırasında acılığını dalında kaybetmesi ve toplandıktan sonra herhangi bir işleme tabi tutulmadan saklanabilmesidir. Bu çalışma ile Karaburun'da yetişen Hurma zeytininin hurmalaşma sürecinde kimyasal karakterizasyonunun yapılması ve mikrobiyal florasındaki değişimin Gemlik ve hurmalaşmamış Erkence zeytinleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ölçülen kimyasal parametreler, pH, su aktivitesi, yağ miktarı, yağ asitleri profili, şeker ve organik asit miktarları, toplam fenol içeriği ile fenol profilidir. Mikrobiyolojik olarak ise Hurma zeytin oluşumunda sözü edilen fungal (*Phoma* spp.) gelişim saptanmış ve olgunlaşma sürecinde mikrobiyal değişim ve çeşitlilik belirlenmiştir.

Hurma zeytinin diğer incelenen zeytinlere nazaran fenol içeriği daha düşüktür ve fenol profili zeytinler arasında istatistiksel olarak bir ayrışmaya neden olmuştur. Ancak zeytinlerin şeker ve organik asit bileşenleri zeytinler arasında bir farklılaşma sağlamamıştır. Yağ asitleri açısından en önemli farklılık Hurma'nın yüksek oranlarda linoleik asit içermesidir; bu durum desaturase enzim aktivitesinin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Yağ asidi profili de zeytinler arasında farklılaşmaya neden olan parametrelerden biridir. Bu sonuçlar ışığında, fenollerin dönüşmesine neden olan β -glukosidaz ve esteraz enzimleri ile yağ asidi sentezinde rol alan desaturase enziminin, Hurma zeytininin ağaçta tatlılaşmasını etkileyen faktörler olabileceği düşünülmektedir.

Hurma zeytinin mikrobiyal florası, Erkence ve Gemlik zeytin çeşitlerine göre oldukça farklılık ve çeşitlilik gösterir ve bu floradan potansiyel bitki patojenlerini, fırsatçı insan patojenlerini ve mikotoksin üretebilme potansiyeli olan küf türlerini içeren mikroorganizmalar izole edilmiştir. Ayrıca Hurma zeytinin izlenen olgunlaşma sürecinde *Phoma* türleri tanımlanmıştır.

Anahtar sözcükler: zeytin, Hurma zeytin, kimyasal karakterizasyon, mikrobiyolojik karakterizasyon

ABSTRACT

The difference of Hurma olive, especially grown in Karaburun Peninsula, from other regular olive types is the loss of its bitterness throughout its maturation period; therefore, no requirement for further processing steps for storage. This project aims at performing the chemical characterization and investigating the changes in the microbial flora of Hurma olive during its debittering phase in comparison to Gemlik and non-debittered Erkence olive types. For this purpose, measured chemical parameters are pH, water activity, oil content, fatty acid profile, sugar and organic acid amounts, total phenol content and phenolic profile. As for microbiologically, fungal growth (*Phoma* spp.) that was previously mentioned for Hurma olive development was determined and microbial change and diversity were identified.

Phenol content of Hurma olive is lower compared to other investigated olives and phenolic profile caused a statistical separation between olive types. However, sugar and organic acid compounds of olives did not provide a differentiation with regard to olive type. The most significant difference in terms of fatty acids is the high content of linoleic acid of Hurma and this is associated with increased desaturase enzyme activity. Fatty acid profile is also one of the parameters that caused differentiation of olive types. Under the light of these findings, β -glucosidase and esterase enzymes which cause transformation of phenols and desaturase enzyme which plays a role in fatty acid synthesis could be thought as the factors affecting the sweetening of Hurma olive on the tree.

Microbial flora of Hurma olive have significant differences and diversity compared to Erkence and Gemlik olive types and microorganisms including potential plant pathogens, opportunistic human pathogens and fungus which have the ability to produce mycotoxins were isolated from this flora. In addition, *Phoma* species were identified during observed maturation period of Hurma olive.

Keywords: olive, Hurma olive, chemical characterization, microbiological characterization

1. GİRİŞ

Türkiye, sofralık zeytin üretiminde yıllara göre değişmekle birlikte Dünya'da İspanya ve Mısır ile birlikte ilk üç sırada yer alan bir ülkedir. Son 5 yılın ortalama sofralık zeytin üretimi 366 bin ton olmuştur (IOC, 2013). Sofralık zeytinin yaklaşık %70'i ülkemizde tüketilmekte geri kalan kısmı ise ihraç edilmektedir. 2007 yılı verilerine göre Ege bölgesi, ülkemizin yıllık sofralık zeytin üretiminin %62,8'ini sağlamaktadır. İl bazında bakılacak olursa, İzmir ise Aydın'dan sonra en çok zeytin ağacına ve zeytin üretimine sahip olan ilimizdir ve Türkiye zeytin üretiminin %13,6'sı İzmir'de gerçekleşmektedir (Öztürk vd., 2009). Dolayısıyla zeytin, Ege bölgesi üreticilerinin gelir sağladığı önemli bir üründür. Ege bölgesinde Ayvalık, Memecik, Domat, Erkence, Uslu, Çakır ve Çilli türleri yaygın olarak yetişmektedir. Ayrıca son yıllarda Gemlik çeşidi de yayılmaktadır. Daha ziyade İzmir'in Karaburun, Çeşme ve Urla ilçelerine özgü bir çeşit olan Erkence zeytininin bir kısmı ağaç üzerinde acılığını kaybederek hurmalaşır ve dalında doğal olarak acılığını kaybeden bu zeytin Hurma olarak adlandırılır. Hurma zeytinin acılığını kaybetmesi için salamura işlemine ihtiyaç duyulmaz. Benzer bir zeytin çeşidi Yunanistan'da da mevcuttur ve 'thrubolea' veya 'Throuba Thassos zeytini' olarak bilinmektedir. Tunus'ta yetişen Dhokar zeytini de yine benzer özelliklere sahiptir. Bu tür zeytin daha dalındayken acılığın kaybolmasının nedeni olarak zeytin etinde gelişen ve acılığa neden olan bir fenol olan oleuropeini hidrolize eden *Phoma oleae* adlı mantar gösterilmiştir (Buzcu, 1969). Hurma zeytini, duyuusal özelliklerinden dolayı bölgede oldukça rağbet görmektedir ve Karaburun yarımadası zeytin yetiştiricileri için ekonomik olarak önemli bir üründür. Bu zeytinin kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri hakkında literatürdeki çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Literatürde zeytinin karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmaların zeytinyağı araştırmalarına göre daha az olduğu görülmektedir. Zeytinyağının sağlık üzerindeki olumlu etkileri özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda daha da ön plana çıkmıştır. Bu etkiler zeytinyağının tekli doymamış yağ asidi kompozisyonu zenginliğinin yanı sıra fenoller gibi minör bileşiklerine bağlanmaktadır. Zeytinyağının kaynağı olarak zeytinin de aynı olumlu sağlık etkilerine sahip olacağı aşıkardır. Ülkemizdeki tüketim durumu verilerine göre kişi başı zeytinyağı tüketimi yıllık yaklaşık 1 L ile sınırlı iken zeytin tüketimi ortalama 3 kg civarındadır (IOC, 2013). Genel olarak tam tersi bir durum, önemli zeytin üreticisi ülkeler için geçerlidir. Dolayısı ile zeytinyağı araştırmalarının paralelinde zeytin ile ilgili araştırmalara da özellikle gerek vardır. Özellikle 'Hurma' zeytini gibi özel bir çeşidin özelliklerinin ortaya çıkarılması bu ürüne katma değer kazandırabileceği gibi bu zeytinin dalında tatlılaşması ile ilgili daha fazla bilgiye sahip olmamıza da yardımcı olacaktır.

Bu proje ile Karaburun bölgesinde yetişen Hurma zeytininin hurmalaşma sürecinde kimyasal ve mikrobiyolojik bazı özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kimyasal parametreler olarak; yağ miktarı, şeker ve organik asit miktarları, yağ asidi profili, toplam fenol içeriği ve fenolik bileşen profilleri belirlenmiştir. Mikrobiyolojik karakterizasyonun amaçlardan biri ise Hurma zeytin oluşumunda sözü edilen olası fungal (*Phoma* spp.) gelişimi/kolonizasyonu farklı besiyerlerinde geleneksel kültürel yöntemle ekim yaparak ve Hurma zeytinden doğrudan örnek alarak moleküler teknik kullanmak suretiyle saptamaktır. Diğer bir hedef ise zeytinin dalında olgunlaşması ve Hurma zeytin olarak yenilebilir hale gelmesi sürecindeki mikrobiyal değişimin zeytinin yetiştirildiği alanda daha önce belirlenen sürelerde ve belirli noktalardan, belirli bir plana göre örnekleme (hava, zeytin ağacı yaprakları ve zeytinden örnek alınması suretiyle) yapılarak pH ve organik asit profili gibi bazı fizikokimyasal özelliklerdeki değişimlerle birlikte belirlenmesidir. Ayrıca karşılaştırmak amacı ile ülkemiz için önemli bir sofralık zeytin türü olan Gemlik zeytini için de tüm kimyasal parametreler belirlenmiş ve mikrobiyal karakterizasyon yapılmıştır. Zeytin de periyodisite önemli bir faktör olduğundan bu çalışmalar iki hasat yılı boyunca yürütülmüştür.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Hurma Zeytini

Hurma zeytini sofralık olarak tüketilen ve İzmir'in daha çok Karaburun yarımadasına özgü bir zeytin türüdür. En büyük özelliği olgunlaşma sırasında acılığını kaybetmesidir. Böylece acılaşmayı giderici işlemlere tabi tutulmadan tüketilebilir. Benzer çeşitlerin Yunanistan ve Tunus'ta da yetiştirdiği belirtilmiştir. 'Dhokar' adı verilen zeytin, Tunus'un güney bölgelerinde diğer çeşitler kadar baskın olmasa da yetişmektedir (Jemai vd., 2009). 'Throuba Thassos' zeytini ise 'Hurma' ile benzer özelliklere sahip bir zeytin olup daha çok Yunanistan'ın kuzeyinde yer alan Taşoz (Thassos) adasında yetişmektedir (Panagou, 2006). Taşoz'da yetişen bu zeytinin Girit'deki Throubaolea cinsinin bir klonu olduğu bildirilmiştir. Yunanistan'da bu tür zeytinlerle yapılan araştırmalar sonucu zeytinin acılığının kaybolmasına, oleuropein'i hidrolize eden *Phoma oleae* isimli bir fungusun neden olduğu belirlenmiştir (Kalogereas, 1932). Ülkemizde ise Zeytincilik Araştırma Enstitüsü tarafından 1969 yılında yapılan bir çalışmada Hurma zeytininin oluşumunda *Phoma oleae* adı verilen mantarın, çeşidin ve iklimin etkisi olduğu, toprağın etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Buzcu, 1969).

2.2. Zeytinin Kimyasal Karakterizasyonu

Türkiye’de zeytin meyvesinin kimyasal karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar kısıtlı olmakla beraber son yıllarda artış göstermiştir. Beş zeytin çeşidi (Gemlik, Kilis, Uslu, Tirilye ve Ayvalık) ile yapılan bir çalışmada bu zeytinlerin nem, ham yağ, ham protein, ham lif ve mineral içerikleri gibi parametrelerin yanı sıra yağ asidi profili ve toplam fenol içeriği de belirlenmiştir (Tanılğan vd., 2007). Bursa’nın üç ilçesinden toplanan Gemlik zeytinleri ile yapılan bir çalışmada ise bu zeytinin pH, toplam asitlik, yağ miktarı, yağ kompozisyonu gibi kalite parametrelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir (Uylaşer vd., 2008). Başka bir çalışmada ise Eylül’den Şubat’a uzanan olgunlaşma süresince Memecik ve Domat zeytinlerinde gerçekleşen kimyasal değişiklikler, nem ve yağ miktarı, yağ kompozisyonu, glukoz ve sukroz ve toplam şeker miktarı ve mineral miktarları ölçülerek belirlenmiştir (Nergiz ve Engez, 2000). Yine diğer bir çalışmada Akdeniz bölgesinde yetişen zeytin türlerinin organik asit içerikleri olgunlaşmaya bağlı olarak belirlenmiştir (Arslan ve Özcan, 2012).

Zeytin iyi bir fenol kaynağıdır ve fenolik maddeler, antimikrobiyal ve antioksidan etkiye sahip oldukları gibi zeytinde *Dacus olea* istilasını önlemede ve zeytinin siyah renginin oluşmasına, esmerleşme reaksiyonu yolu ile katkıda bulunmaktadır (Ryan ve Robards, 1998). Ayrıca, fenolik bileşiklerin miktarları zeytinin tekstürel ve duyusal karakterlerini de etkilemektedir (Bianco ve Ucella, 2000). Antioksidan özelliklerinden dolayı fenollerin insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri çeşitli çalışmaların konusu olmuştur. Bu bileşikler özellikle serbest radikal oluşumundan kaynaklanan hastalıkların engellenmesinde etkili görünmektedir (Saija ve Ucella, 2001). Örneğin saf oleuropeinin *in vivo* çalışmalarda toplam kolesterol ve trigliserit seviyesini düşürdüğü belirlenmiştir (Andreadou vd., 2006). Zeytinin önemli fenolik bileşikleri fenolik asitler, fenolik alkoller, flavonoidler ve secoiridoidlerdir. Fenolik asitler, kafeik asit, o- ve p- kumarik asit, vanilik asit, p-hidroksibenzoik asit, p-hidroksifenil asetik asit ve ferulik asittir. Tyrosol ve hidrosityrosol, fenolik alkoller grubunda yer alır. Önemli secoiridoidler ise oleuropein ve ligustrosidedir. Ayrıca bu gruba demethyloleuropein ve elenolik asit gibi oleuropein türevleri de dahildir. Apigenin ve kuersetin ise zeytinde tespit edilen flavonoidlerdendir. Zeytinin olgunlaşması sırasında fenollerde olan en büyük değişiklik zeytine acılık veren oleuropeinin azalması ve tyrosol ve hidrosityrosol miktarlarının artmasıdır (Ryan ve Robards, 1998).

Yunanistan’da dokuz ticari zeytin çeşidi ile yapılan çalışmada Throuba Thassos zeytininin diğer çeşitlere göre daha yüksek miktarda oleuropein içerdiği tespit edilmiştir. Diğer çeşitlerde ise hidrosityrosol miktarı Throuba zeytinine göre fazladır (Zoidou vd., 2010). Yine dalında acılığını yitiren Tunus’un Dhokar zeytin çeşidi ile yapılan bir çalışmada olgunlaşma süresince bu zeytinin ve Tunus’a özgü ve çok yetiştirilen Chemlali çeşidinin fenol profilleri izlenmiştir (Jemai vd., 2009). Bu çalışmada bu iki zeytin türü için oleuropeinin, olgunlaşmanın

erken dönemlerinde en önemli fenolik madde olduğu belirtilmiştir. Olgunlaşma sırasında iki zeytinde de oleuropein miktarı düşmekte ve hidrokisityrosol miktarı artmaktadır. Ancak Dhokar zeytininde oleuropein miktarı hasattan önce çok düşük seviyelere inerken Chemlali'de hala ölçülecek seviyede oleuropein olduğu belirlenmiştir. Ayrıca olgunlaşma sırasında toplam fenol değeri ile indirgen şeker, glukoz ve manitol seviyelerinde de önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Türk sofralık zeytinlerinin fenol profilleri hakkında literatürde bulunan çeşitli çalışmalar zeytin türüne ve olgunlaşma durumuna göre profillerin farklılıklar gösterdiğini işaret etmektedir (Dağdelen vd., 2012; Yorulmaz vd., 2012).

Şeker ve organik asitler de zeytinin önemli bileşenlerindedir. Şekerler metabolik değişimler için enerji sağlamanın yanısıra meyvenin tekstürel özellikleriyle de ilgilidirler. Buna ek olarak şekerler, yağ asidi biosentezinde öncül olarak görev yapmaktadır ve sofralık zeytin işleminde rol alan mikroorganizmalar için karbon kaynağıdır (Marsilio vd., 2001). Zeytinde bulunan başlıca şekerler glukoz, fruktoz, galaktoz ve manitol olarak belirlenmiştir. Manzanilla, Gordal, Hojiblanca ve Verdial çeşitlerinde en çok glukoz bulunmaktadır (Fernandez-Bolanos vd., 1983). Thassos çeşidinde ise glukoz ve manitol yakın seviyelerdedir (Marsilio vd., 2001). Hurmaya benzer özellikleri olan Dhokar çeşidinde ise manitol, miktarı fazla olan şekerdir ve dalında tatlılaşmayan Chemlali çeşidi ile karşılaştırıldığında bu iki zeytinin şeker konsantrasyon profillerinde önemli ölçüde farklılık olduğu tespit edilmiştir (Jemai vd., 2009). Araştırmacılar bu farklılığı zeytinin çeşidi ve yetiştirildiği bölge ile ilişkilendirmişlerdir. Türk zeytinleri ile yapılan bir araştırmaya göre suksinik, malik ve sitrik asitler başlıca organik asitler olarak belirlenmişlerdir (Ergönül ve Nergis, 2010). Organik asitler tamponlama kapasitelerinden dolayı zeytin işleminde önemlidirler. Organik asitlerin zeytinlerin renk ve aromasını da etkilediği de bilinmektedir (Joslyn, 1970).

2.3. Zeytinin Mikrobiyolojik Karakterizasyonu

Zeytinin doğal mikrobiyolojik florası bakteri, maya ve küfler olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Zeytinin yüzeyinde bulunan mikroorganizmaların tipi ve oranı/karışımı, iklim koşulları, zeytinin çeşidi ve zeytinin olgunluk aşaması ile ilgilidir. Zeytinde doğal olarak bulunan mikroorganizmalar, fermentasyonu başlatır. Nychas vd. (2002) mayaların zeytinin yüzeyinde ve stomal açıklığında baskın olduğunu, bakterilerin ise sub-stomal hücrelerin hücrelerarası boşluklarında baskın olduğunu bildirmiştir. Taze zeytinlerde doğal olarak bulunan laktik asit bakterilerinin belirlendiği bir çalışmada *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus mesenteroides*, *Lactobacillus lactis spp. lactis* ve *Pseudomonas damnosus* türüne ait mikroorganizmalar saptanmıştır (Korukluoğlu vd., 2002). Zeytin ağacından toplanan zeytin yaprağı ve zeytin salamurasından

izole edilen 193 laktik asit bakterisi *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc* spp., *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmıştır (Lavermicocca vd., 1998). Aynı çalışmada meyve ve salamura edilmiş zeytin arasında populasyon farklılıkları bulunmuştur. Araştırmacılar hemen hemen her izolatin oleuropein glukozitini degrade ettiğini ancak degradasyon hızının farklı olduğunu belirtmişlerdir.

Asıl olarak Yunanistan (Girit, Ege adaları ve Attica bölgesi)'da yetişen Throuba tipi (Thrubolea) zeytinin, bir fungal enzim tarafından acılığının giderildiği ve değişime uğradığı düşünülmektedir. Zeytinler siyahtan bakır yeşiline rengini değiştirmekte ve daha sonra güneşte kurutularak tuzlanmaktadır. Ancak, bu zeytin tipinde acılığın giderilmesinde bir fungusun rolü olduğunu destekleyen çok az bilgi mevcuttur (Kailis ve Harris, 2007). Hurma zeytine benzer şekilde kuru tuzlama yapılan bir zeytin tipi olan “naturally black olives-throuba style” asıl olarak Girit’de yerleşik olarak bulunmaktadır. Tamamen olgun olduğu zaman zeytinin yüzeysel rengi kahverengi olmakta ve zeytin herhangi bir uygulama yapılmaksızın doğrudan ağaçta acılığını kaybetmektedir. Daha önceki bir çalışmaya göre zeytindeki acılığın zeytin etinde gelişen ve oleuropeini hidrolize eden *Phoma oleae* adlı mantarın bulunmasına dayandığı ifade edilmiştir (Kalogereas, 1932). Oleuropeinin enzimatik hidrolizinin özellikle bakteriler ve fungusların her ikisinin de ürettiği β -glukozidaz enzimi ile gerçekleştiği literatürde çok açık bir şekilde ortaya koyulmuştur (Copa-Patino vd., 1990; Know vd., 1992; Ciafardini vd., 1994; Ciafardini ve Zullo, 2000).

Phoma spp. (Sphaeropsidales) çok farklılaşmış, biyolojik olarak özelleşmiş bir fungus grubunu oluşturmaktadır (Marcinkowska, 1995). Bu grup farklı substratlarda gelişen, parazit karakterindeki bitkilerin ikincil patojenlerinin ve yetiştirilen bitkilerin özellikli patojenlerinin yer aldığı saprofit türleri içine almaktadır. Anamorphic *Phoma* cinsi 220’den fazla özellikli ve intraspesifik taxa içermektedir (Boerema vd., 2004). *Phoma* cinsi içerisinde bilinen *Phoma* türlerinin, *in vitro* olarak doğrulanmış ve literatürde tanımlanan binlerce türün sadece bir kısmı olan taxanın gerçek sayısının muhtemelen çok daha fazla olabileceği belirtilmiştir (Aveskamp vd., 2008). *Phoma* cinsine ait fungusların izole edildiği bitki grubu otsu/yeşil yaprağa benzer olarak adlandırılan bitkileri kapsamaktadır (Machowicz-Stefaniak vd., 2002; Machowicz-Stefaniak vd., 2004). Örnek olarak; sıradan kekiğin yaprakları, sapları ve köklerinden *Phoma dictamnica* Boerema, de Gruyter et Noordel., *P. glaucii* Brun., *P. multirostrata* var. *microspora* (Allescher) Boerema izole edilmiş, diğer bazı bitkilerden (creemocarps) ise *P. eupatorii* Died izole edilebilmiştir (Machowicz-Stefaniak ve Zimowska, 2000; Machowicz-Stefaniak vd., 2002). Kekik, melisa/oğulotu ve sarı kantaron (St. John’s wort) bitkilerinin kökleri, sapları ve yapraklarından *P. exigua* var. *exigua* Desm. ve *P. glomerata* (Corda) Wollenw. et Hochapf. izole edilmiştir (Machowicz-Stefaniak vd., 2004).

Siyah kök çürümesinin (black rot) belirtisini gösteren *P. strasserii* Moesz.'nin izolatları nane sap/gövdesinden ve rhizomundan elde edilmiştir (Zimowska ve Machowicz-Stefaniak, 2005). *Phoma* başka bir çalışmada ise genç zeytin ağaçlarından izole edilmiştir (Sanchez Hernandez, 1995). Küçük sporlara sahip bazı *Alternaria* türlerinin normal koşullarda ürettiği biyolojik olarak etkin toksik bir bileşik olan tenuazonic asiti *Phoma sorghina*'nın ürettiği bildirilmiştir (Shephard vd., 1991; Andersen vd., 2002). *Brassica* cinsine ait bitkilerde "blackleg" hastalığının etmeni, *Phoma lingam* (sexual stage *Leptosphaeria maculans*)'in bazı biyolojik olarak etkin bileşikler ürettiği bildirilmiştir (Pedras ve Chumala, 2005). Çok iyi tanımlanmış *Phoma* suşları tarafından metabolit üretimi üzerine sınırlı sayıda rapor olmasına karşılık *Phoma* türlerinin gıdalarda ve yemlerde bulunması, biyolojik olarak etkin ikincil metabolitlerin olası üretimi nedeniyle merak ve ilgi konusu olmaktadır.

Literatürde hurmalaşmaya etken olan *Phoma oleae* isimli mantar hakkında taksonomik ve tarımsal alanlarda herhangi bir kayıta rastlanmamıştır. *Phoma* grubu içerisinde 2 alt tür (*Phoma fallens*, *Phoma insulana*), zeytin bitkisi ve meyvesi üzerinde enfeksiyona neden olmaktadır. *Phoma fallens*, yapraklarda ve meyvede lekeler şeklinde semptomlar göstermektedir. *Phoma insulana* ise, Kuzey yarı kürede ve Güney Avrupa'da görülen ve meyvelerde renk değişimi ve olgunlaşmaya neden olan bir mantardır (Boerema vd., 2004).

2.4. Mikroorganizmaların Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

2.4.1. Laktik Asit Bakterileri ve Mayaların Moleküler Yöntemle Tanımlanması

Son yıllarda mayaların tanımlanmasında moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Maya türlerinin tanımlanmasında kullanılan en geçerli moleküler yöntemler 5.8S, 18S ve 26S ribozomal genlerin çeşitliliğine dayanmaktadır (Cai vd., 1996; James vd., 1996; Kurtzman, 1992). Daha önceki çalışmaların sonuçları karmaşık ITS bölgelerinin (non-coding ve değişken) ve 5.8S rRNA geni (coding and korunmuş), 18S ve 26S rRNA genlerinden daha fazla interspesifik farklılıklar göstermekten çok uzak olduğu için, yakın fungal filogenetik ilişkileri ölçmede faydalı olduğunu göstermiştir (Cai vd., 1996; James vd., 1996; Kurtzman, 1992).

2.4.2. Phoma Suşlarının Moleküler Yöntemle Tanımlanması

Literatürde Hurma zeytin oluşumuna neden olan mikroorganizmanın *Phoma oleae* isimli bir mantar olduğu belirtilmekle birlikte bu mikroorganizma ile ilgili taksonomik ve tarımsal alanlarda herhangi bir kayıta rastlanmamıştır (Kalogereas, 1932; Buzcu, 1969; Boerema vd., 2004). Ancak bu konuda daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler ve teknikler göz önüne alındığında çok sınırlı, daha az hassas ve güvenilir sonuçlar

alınabileceği açıktır. Zeytinden izole edilen mayaların tanımlanmasında moleküler yöntemlerin kullanıldığı çok az çalışma bulunmaktadır (Arroyo-Lopez vd., 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnekleme

Üç tip zeytin incelenmiştir: Erkence (E), Hurma (H, doğal yolla acılığını kaybeden Erkence) ve Gemlik (G). Zeytin örnekleri 2011/2012 hasat yılında 14.11.2011 ve 2.12.2011 tarihleri arasında ve 2012/13 hasat yılında ise 16.11.2012 ve 4.12.2012 aralığında 8 hafta boyunca haftalık olarak, belirlenen ağaçlardan elle toplanmıştır. Hurma ve Erkence örnekleri Karaburun'a bağlı Eğlenhoca köyünde (enlem: 38°54'07"N, boylam: 26°57'24"E) bir zeytin bahçesinde belirlenen 3 ağaçtan ağaç başına yaklaşık 1 kg olmak üzere el ile toplanmıştır. Gemlik örnekleri ise yukarıda belirtilen bahçenin yaklaşık 30 km güneyinde bulunan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ne ait bahçelerden (enlem: 38°19'30.84"N, boylam: 26°37'48.87"E) elde edilmiştir (Şekil 1). Mikrobiyolojik analizler için zeytin ve yaprak örnekleri steril bir şekilde kavanozlara alınmıştır. Hava örnekleri de yine aynı bahçelerden temin edilmiştir. Hurmalaşmanın başlama zamanı zeytinin buruşmaya yüz tuttuğu zaman olarak belirlenmiştir. Örnekler bekletilmeden laboratuara getirilmiş ve gerekli işlemler yapılmıştır. Kimyasal analizler için zeytin örneklerinin çekirdekleri çıkarılmış ve daha sonra örnekler liyofilize edilerek (Labconco, ABD) -20°C'de saklanmıştır. Başka türlü belirtilmediği takdirde zeytinlerin kodlamasında kullanılan harflerden (E, H ve G) sonra gelen ilk rakam hasatın yapıldığı haftayı (1-8) ve ikinci rakam da hasat yılını gösterir (1-2).



Şekil 1. Zeytin örnekleme lokasyonları (www.karayollari-haritasi.com)

3.2. Kimyasal Analizler

3.2.1. Olgunlaşma İndisi

Örneklerin olgunlaşma indisleri literatürde belirtilen bir yöntemle belirlenmiştir (Morello vd., 2005). Bunun için 100 adet zeytinin kabuk ve et rengine göre bir sınıflandırma yapılmaktadır.

3.2.2. Rutin Analizler

Zeytin homojenatlarının pH ölçümü pHmetre (WTW 720 Series, Almanya) ile yapılmıştır. Zeytinlerin su aktiviteleri, su aktivitesi cihazı (Hygrolab-3, Rotronic Instruments, İsviçre) ile oda sıcaklığında tespit edilmiştir.

3.2.3. Şeker Tayini

Zeytin örneklerinin şeker miktarları refraktif indeks detektörüne bağlı bir HPLC (Agilent 1200, ABD) ile belirlenmiştir. Ekstraksiyon ve analizin gerçekleştirilmesinde Lopez-Lopez vd. (2007) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için 5 g liyofilize zeytine internal standart olarak 5 mL %0,1 sorbitol eklenip örnek 60°C'de ultrasaf su ile 50 mL'ye tamamlanıp 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra 9000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenen (Sigma-2-16KC santrifüj, İngiltere) örneğin üst fazı 0,45 µm'lik filtrelerden viallere süzülmüştür. Hazırlanan ekstraktdan 50 µL, HPLC'ye enjekte edilmiştir. Şeker analizi için HPLC koşulları aşağıdaki gibidir:

Mobil faz: 0.05 M H₂SO₄

Kolon: Biorad HPX-87C (300*7,8 mm ID)

Kolon Sıcaklığı: 65°C

Akış hızı: 0,7 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 50 µL

Şeker standardı olarak glukoz, fruktoz, laktoz, manoz, manitol ve sukroz kullanılmıştır. Her örnekten iki ekstraksiyon ve ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar mg/kg kuru madde cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.4. Organik Asit Tayini

Zeytinlerin organik asit profili refraktif indeks detektörüne sahip bir HPLC (Agilent 1200, ABD) ile belirlenmiştir. Organik asit ekstraksiyonu ve HPLC analizi, Lopez-Lopez vd.'i (2007) tarafından kullanılan yöntemle göre yapılmıştır. Organik asit analizi için HPLC koşulları aşağıda listelenmiştir:

Mobil faz: 0.05 M H₂SO₄ çözeltisi

Kolon: Biorad HPX-87H (300*7,8 mm ID)

Kolon Sıcaklığı: 65°C

Akış hızı: 0.7 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 50 µL

Laktik, asetik, malik, sitrik ve suksinik asitler standart olarak kullanılmıştır. Her örnekten iki ekstraksiyon ve ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar mg/kg kuru madde cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.5. Toplam Fenol İçeriği

Gallik asit cinsinden toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteau solüsyonu ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Bouaziz vd., 2004). Toplam fenol analizi için 0,3 g liyofilize örnek tartılmış ve örnek 5 kez 5 mL metanolla çalkalanıp ekstrakt bir beherde toplanmıştır. Toplanan ekstraktın metanolü vakumlu döner buharlaştırıcıda (Laborato 4000 Heidolph, Almanya) 45°C'de yaklaşık 20 dakikada uçurulmuştur. Elde edilen ekstrakt, 5 mL metanolla çözülüp 100 µL'si cam bir tüpe alınmıştır. Ekstraktın üzerine 2,5 mL 10 kat seyreltilmiş Folin–Ciocalteau çözeltisi ilave edilip yaklaşık 8 dakika sonra 2 mL Na₂CO₃ (75 g/L) eklenmiştir. Örnekler 40°C'de su banyosunda 15 dakika bekletilip soğutulmuştur. Kontrol örnek için aynı prosedür 100 µL'lik deonize suya uygulanmıştır. Örneklerin abzorbansları 765 nm'de bir spektrofotometre (PG Instruments, İngiltere) ile ölçülmüştür. Toplam fenol miktarları oluşturulan gallik asit standart eğrisinden hesaplanmıştır. Her örnekten üç ekstraksiyon ve ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar mg gallik asit eşleniği/100 g kuru madde (mg GAE/100g) olarak ifade edilmiştir.

3.2.6. Fenol Profili

Fenol ekstraksiyonu ve analizi literatürde verilen bir yöntemle belirlenmiştir (Rioz ve Gutierrez-Rosales, 2010). Fenol profili analizleri için liyofilize zeytin örneklerinden 1 g tartılmıştır. Daha sonra örnekler, 15 mL EtOH:su (80:20) çözeltisiyle 2 kez ekstrakte edilmiştir. 1 mL internal standart (150 ppm p-hydroxyacetic acid) ilavesinden sonra örnekler 5 dakika homojenize (Heidolph, Almanya) edilip vakum filtrasyon ünitesinden süzölmüştür. Dönerli buharlaştırıcıda (Laborato 4000 Heidolph, Almanya) 40°C'de 20 dakika boyunca etanol uçurulduktan sonra kalan etanol azot gazı akışı ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt yaklaşık 30 mL hekzan ile 2 kez yıkandıktan sonra hekzan, yağ ve ekstrakt ayırma hunisi yardımıyla ayrılmıştır. Kalan hekzan yine azot kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Ekstrakt, su:methanol (70:30) çözeltisi ile 25 mL'ye tamamlanıp 0,45 µ'luk filtrelerden viallere süzölmüştür. Hazırlanan örnekler diode array (DAD) detektörüne bağlı bir HPLC (Agilent 1200, ABD) sistemine enjekte edilmişlerdir. HPLC koşulları aşağıda listelenmiştir ve Tablo 1'de mobil fazın değişim profili verilmiştir:

Mobil Faz A : su:asetik asit (99,9:0,1)

Mobil Faz B : MeOH:asetonitril:asetik asit (50:50:0,1)

Dalga Boyu : 280 nm

Kolon : SGE 8211 C18 (250*4mm, 5µm)

Sıcaklık : 30°C

Akış oranı : 1 mL/dk

Enjeksiyon hacmi : 20 µL

Tablo 1. HPLC analizinde kullanılan mobil fazların sıcaklıkla değişim programı

Zaman (dak)	% A	%B
0	95	5
45	45	55
55	0	100
60	0	100
65	95	5
70	95	5

Standart olarak kullanılan fenolik bileşikler oleuropein, oleuropein aglikonu, tyrosol, rutin, hidroksityrosol, kuersetin-3-glukozit, kuersetin, luteolin, luteolin-7-glukozit, verbaskozit, vanilin, vanilik asit, ferulik asit, o-kumarik asit, p-kumarik asit, syringic asit, kafeik asit, apigenin, apigenin-7-glukozittir. Her örnekten iki ekstraksiyon ve ölçüm yapılmıştır. Fenolik bileşikler en az dört nokta içeren kalibrasyon grafiklerini kullanarak hesaplanmış ve mg/kg kuru madde olarak ifade edilmiştir.

3.2.7. Yağ Asidi Profili

Zeytinlerden yağ ekstraksiyonu hekzan kullanılarak Soxhlet ekstraksiyonu (Gerhard Multistat, Almanya) ile yapılmıştır. Zeytinden elde edilen yağ, hekzan içinde çözülerek metanolik KOH ile metil esterlerine dönüştürülmüştür (EEC, 1991) ve yağ asitleri profili flame ionization detektörüne (FID) sahip gaz kromatografi cihazı (Agilent 6890N, ABD) ile belirlenmiştir. Kolon olarak özellikle zeytinyağları için tercih edilen HP 88 (100 m x 0.25 mm ID, 0.2 µm), kapiler kolon kullanılmıştır. 37'li FAME karışımı (Sigma) standart olarak kullanılmıştır.

3.3. Mikrobiyolojik Analizler

3.3.1. Hava Örnekleme

Hava örnekleri yerden en az 1,5 m yukarıdan petri plakasına çöktürme (sedimentation) yöntemi ve hava örnekleme cihazı (Sartorius) kullanmak suretiyle çarptırma

(impaction) yöntemi uygulanmak suretiyle alınmıştır. Toplam canlı, *Enterobacteriaceae* ve maya-küf sayımları için genel amaçlı besiyerleri kullanılmıştır. Bu amaçla PCA, VRBA, PDA ve MEA besiyerleri bulunan petripler çöktürme yönteminde petri kaplarının kapakları açılmak suretiyle 15 dk süresince örnekleme yapılan zeytin bahçesinde havaya maruz bırakılmıştır. Her örnekleme için 3 petri kullanılmıştır. Çarptırma yönteminde ise belirli sürede belirli hacimdeki hava örneği, hava örnekleme cihazı ile 5 dk hava çekilerek, besiyerine çarptırılmıştır. Her örnekleme için 3 petri kullanılmıştır. Her iki yöntemde de inokülasyon yapılan petripler mikroorganizma için uygun sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakılmış, inkübasyon süresi sonunda, mikroorganizma sayısı tespit edilmiştir. Gelişen kolonilerden temsili sayıda izolat alınmıştır. İzolatların tamamı saflaştırılmış, bakterilerin, maya ve küflerin tanımlanması yapılmıştır.

3.3.2. Mikroorganizma Sayımları

Hava, zeytin yaprağı ve zeytin örneklerindeki mikroorganizma sayısının ve mikrobiyal populasyonun çeşidinin belirlenmesi için geleneksel kültürel sayım yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla örneklerde homojenizasyon (Interscience, Fransa) ve uygun dilüsyonlar (steril 1/4 Ringer's çözeltisi) yapıldıktan sonra besiyerlerine paralel ekim yapılmıştır. Maya ve küf sayımı tartarik asit ilave edilmiş PDA (pH=3,5), Sabouraud dextrose agar (0,1 g/L chloramphenicol) ve Rose Bengal Chloramphenicol agar (RBCA, selective supplement SR 78) besiyerlerinde 25°C'de 48–72 h inkübasyon yapılarak elde edilmiştir. Toplam bakteri, laktik asit bakterisi, *Enterobacteriaceae* sayıları sırasıyla PCA besiyerinde, 30°C'de 24–48 h; MRSA besiyerinde, 25°C'de 48–72 h; VRBDA besiyerinde 37°C'de 18–24 h inkübasyon yapılarak elde edilmiştir. *Staphylococci* ve *Micrococcaceae*, Baird-Parker agar (BPA) besiyerinde 37°C'de 24–48 h süre inkübasyon yapılarak elde edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda petriplerde gelişen koloniler sayılarak mikroorganizma grupları ve sayıları belirlenmiştir. 2011 ve 2012 yıllarında olgunlaşma sürecinde Hava, zeytin yaprağı ve zeytin örneklerindeki mikroorganizma sayısının ve mikrobiyal populasyonun çeşidinin belirlenmesi tamamlanmıştır.

3.3.3. İzolasyon ve İzolatların Saklanması

Mikrobiyolojik analiz gerçekleştirilen besiyerlerinde gelişmiş olan kolonilerden temsili sayıda alınarak genel amaçlı besiyeri yüzeyine çizim (bakteri veya maya kolonileri için) veya üç nokta ekim (küf kolonileri için) yöntemi ile ekim yapılmış ve izolatlar saflaştırılmıştır. İzolatların tanımlanmasının ilk aşaması olan saflık kontrolü basit ve gram boyama ile belirlendikten sonra izolatlar daha sonraki tanımlama testlerinin uygulanması amacıyla uygun besiyerlerinde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.4. Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Morfolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Testler

Proje kapsamında izole edilen bakterilerin tanımlanmasında Bergey's Manual ve Kostinek vd. (2005) tarafından belirlenen taksonomik anahtarlardan yararlanılmıştır. Bakterilerin tanımlanmasında hücre morfolojisi, gram boyama ve katalaz testleri yapılmış, glikozdan gaz üretimi, 20 anahtar karbonhidratın fermantasyonu denemeleri tamamlanmıştır. Referans kültür kullanılmak suretiyle bakteriler için kullanılacak olan primer belirlenmiş ve dizaynı yapılmıştır. DNA ekstraksiyonu ve izolasyonu aşamalarından sonra konvansiyonel PCR ve sekans analizleri yapılarak moleküler tanımlama yöntemi oturtulmuş ve bakterilerin moleküler tanımlanması yapılmıştır. 2011 ve 2012 yıllarına ait bakterilerin biyokimyasal ve moleküler tanımlaması için gereken DNA ekstraksiyonu ve izolasyonu aşamaları ve PCR ürünlerinin sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan DNA ekstraksiyonu ve izolasyonu yöntemi izleyen bölümde verilmektedir.

3.3.4.1. Bakteri İzolatları İçin Kullanılan DNA Ekstraksiyonu ve PCR Metodu

İzole edilen bakteri kültürlerinden genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır (Cardinal vd., 1997). PCR amplifikasyonu 25 µl PCR karışımı ile (5 µl genomik DNA, 10 pmol forward primer, 10 pmol of reverse primer, 2,5µl dNTP (2 µM), 2,5 µl Taq polymerase tampon (Fermentas), 1,5 µl (25mM) MgCl₂ (Fermentas) ve 1U Taq polymerase (Fermentas) kullanılarak yapılmıştır. Genomik DNA amplifikasyonu BIO-RAD C1000 thermal cycler (Fransa) ile optimize edilmiş olan aşağıdaki PCR koşullarına göre gerçekleştirilmiştir.

1. 94 °C 'de 5 dk
 2. 94 °C 'de 1 dk denatürasyon
 3. 56 °C 'de 1 dk birleşme
 4. 72 °C 'de 1 dk uzama
 5. 72 °C 'de 10 dk son uzama
- } 40 döngü

Bakteri izolatlarının PCR denemelerinde kullanılan primerler ve dizileri aşağıdaki gibidir.

Forward Primer: EGE1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Reverse Primer: EGE2: 5'CTACGGCTACCTTGTACGA-3'

Forward Primer : 341F: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Reverse Primer 518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Amplifiye olmuş gen bölgesinin ne kadar baz çifti çoğaltdığını görebilmek için etidium bromid içeren %1'lik agaroz jel ile elektroforez yapılmıştır. 80 mV elektrik akımı %1 TAE tampon içeren elektroforez tankında elektroforez gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.2. Bakteri İzolatları İçin Kullanılan DNA Dizi Analizi

Amplifiye edilmiş PCR ürünleri sephadex kolondan 4800 rpm'de 2 dk süresince geçirilerek safsızlık unsurları giderilmiştir. Ardından döngü sıralaması aşağıda verilen koşullara göre yapılmıştır.

1. 96 °C for 1 k
 2. 96 °C for 10 s
 3. 50 °C for 5 s
 4. 60 °C for 4 dk
 5. 4 °C, ∞
- } 30 döngü

Döngü sıralamasının PCR'dan en önemli farkı, yalnızca tek yönde primer kullanılarak üst üste katlanış yerine lineer amplifikasyon ürünü elde edilmesidir. Diğer önemli ayrımı ise, dideoksinükleotidlerin DNA tekli sarmalının birleşeceği zaman uzamasının kesilmesi amacıyla kullanımınıdır. DNA dizi analizi 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. Analiz tamamlandığında, nükleotid dizilimi sonuçları bir yazılım (Finch TV v.1.4.0, Geospiza. Inc., ABD) vasıtasıyla değerlendirilerek; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> internet sitesindeki BLAST sunucu ara yüzünden benzer dizilime sahip mikroorganizmalar araştırılarak bakteri kültürleri tanımlanmıştır.

3.3.5. Küflerin Tanımlanmasında Kullanılan Morfolojik ve Moleküler Testler

Proje kapsamında izole edilen küflerin standart mikroskopik ve morfolojik tanımlanmasında Pitt (1979, 2000) ve Samson vd. (1981, 2004), Klich (2002) tarafından oluşturulan klasik referanslarda belirtilen ölçütler kullanılmakla birlikte *Aspergillus* tanımlamada Raper ve Fennell (1977) ile Samson vd. (1981, 2004) tarafından önerilen tanımlama anahtarları, *Rhizopus* türlerinin tanımlanmasında Schipper (1978)'in tanımlama anahtarı, diğer küf cinslerine ait türlerin tanımlanmasında ise Cooney ve Emerson (1964), Domsch vd. (1980) ve Mouchacca (2000) tarafından geliştirilen tanımlama anahtarları kullanılmaktadır.

3.3.5.1. Küf İzolatları İçin kullanılan DNA Ekstraksiyonu ve PCR metodu

Moleküler tanımlama yapabilmek için öncelikle Hurma zeytinden izole edilen küf kültürlerinin genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır (Bartlett ve Stirling, 2003). Kısaca MEA veya CZA'da geliştirilen küf kolonisi bir havan ve tokmak yardımı ile mekanik olarak ezilerek hücre duvarının parçalanmıştır. Böylece genetik materyal açığa çıkarılarak ekstraksiyon işlemine maruz bırakılmıştır. Örnekler sonrasında 10 mL CTAB ekstraksiyon tamponu içerisine aktararak, tüm örnek yüzeyine etki etmesi için çalkalamalı su banyosunda 65°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında eşit hacimde chloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek oda sıcaklığında 2000 g'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Sonrasında supernatant yeni

bir tüpe alınarak, üzerine eşit hacimde isopropanol eklenmiştir. Bu aşama sonrası DNA presipitasyonu oluşması beklenmektedir. Ancak DNA gözlenmediği durumda %70 'lik etanol ile örnek yıkanıp açık havada kurutularak 1 ml, 20 µL/ml RNase içeren TE eklenerek örnekler suspend edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.

Metot 1

İzole edilen maya kültürlerinden genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır (Cardinal vd., 1997). PCR amplifikasyonu 50 µl PCR karışımı ile (5 µl genomik DNA, 0,2 pmol forward primer, 0,2 pmol of reverse primer, 5 µl dNTP (2 µM), 5 µl Taq polymerase tampon (Fermentas), 3 µl (25mM) MgCl₂ (Fermentas) ve 0.5 U Taq polymerase (Fermentas) ile gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA amplifikasyonu BIO-RAD C1000 thermal cyclers (Fransa) ile aşağıdaki koşullara göre yapılmıştır. Amplifiye olmuş gen bölgesinin ne kadar baz çifti çoğaltıldığını görebilmek için etidium bromid içeren %1'lik agaroz jel ile elektroforez yapılmıştır. 100 mV elektrik akımı içe %1 TAE tampon içeren elektroforez tankında işlem gerçekleştirilmiştir.

1. 94 °C 'de 5 dk
 2. 94 °C 'de 1 dk denatürasyon
 3. 53 °C 'de 2 dk birleşme
 4. 72 °C 'de 2 dk uzama
 5. 72 °C 'de 10 dk son uzama
- } 40 döngü

Kullanılan primerler ise: aşağıdaki gibidir.

Forward Primer: ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

Reverse Primer: ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Metot 2

PCR amplifikasyonu 25 µl PCR karışımı ile (5 µl genomik DNA, 10 pmol forward primer, 10 pmol of reverse primer, 2.5 µl dNTP (2 µM), 2.5 µl Taq polymerase tampon (Fermentas), 1.5 µl (25mM) MgCl₂ (Fermentas) ve 1U Taq polymerase (Fermentas) kullanılarak yapılmıştır. Genomik DNA amplifikasyonu BIO-RAD C1000 thermal cyclers ile iki farklı primer çifti için aşağıdaki koşullara göre gerçekleştirilmiştir. Amplifiye olmuş gen bölgesinin ne kadar baz çifti çoğaltıldığını görebilmek için etidium bromid içeren %1 'lik agaroz jel ile elektroforez yapılmıştır. 80 mV elektrik akımı içe %1 TAE tampon içeren elektroforez tankında işlem gerçekleştirilmiştir.

1. 95 °C 'de 8 dk
 2. 95 °C 'de 15 s denatürasyon
 3. 52 °C 'de 20 s birleşme
 4. 72 °C 'de 1 dk uzama
 5. 72 °C 'de 5 dk son uzama
- } 35 döngü ACT 512F ve ACT 783R primerleri

1. 94 °C 'de 5 dk
 2. 94 °C 'de 30 s denatürasyon
 3. 48 °C 'de 30 s birleşme
 4. 72 °C 'de 1 dk uzama
 5. 72 °C 'de 7 dk son uzama
- } 35 döngü ITS4 ve V9G primerleri

Kullanılan primerler ise aşağıdaki gibidir:

Forward Primer: ACT 512F (5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3')

Reverse Primer: ACT783R (5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3')

Forward Primer: ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Reverse Primer: V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3')

3.3.5.2. Küf İzolatları İçin Kullanılan DNA Dizi Analizi

Metot 1

Amplifiye edilmiş PCR ürünleri sephadex kolondan 5400 rpm'de 2 dk süresince geçirilerek safsızlık unsurları giderilmiştir. Ardından döngü sıralaması aşağıda verilen koşullara göre yapılmıştır.

1. 96 °C'de 1 dk
 2. 96 °C'de 10 s
 3. 53 °C'de 5 s
 4. 60 °C'de 4 dk
 5. 4 °C, ∞
- } 30 döngü

Metot 2

Amplifiye edilmiş PCR ürünleri sephadex kolondan 4800 rpm'de 2 dk süresince geçirilerek safsızlık unsurları giderilmiştir. Ardından döngü sıralaması aşağıda verilen koşullara göre yapılmıştır.

1. 96 °C for 1 k
 2. 96 °C for 10 s
 3. 50 °C for 5 s
 4. 60 °C for 4 dk
 5. 4 °C, ∞
- } 30 döngü

Döngü sıralamasının PCR'dan en önemli farkı, yalnızca tek yönde primer kullanılarak üstüste katlanış yerine lineer amplifikasyon ürünü elde edilmesidir. Diğer önemli ayrımı ise, dideoksinükleotidlerin DNA tekli sarmalının birleşeceği zaman uzamasının kesilmesi amacıyla kullanımıdır. DNA dizi analizi 3130x/ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD)

cihazında gerçekleştirilmiştir. Analiz tamamlandığında, nükleotid dizilimi sonuçları bir yazılım (Finch TV v.1.4.0, Geospiza. Inc., ABD) vasıtasıyla değerlendirilerek; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> internet sitesindeki BLAST sunucu arayüzünden benzer dizilime sahip mikroorganizmalar araştırılarak kültürler tanımlanmıştır.

DNA dizi analizi 3130xl Genetic Analyzer cihazında gerçekleştirilmiştir. Analiz tamamlandığında, nükleotid dizilimi sonuçları bir yazılım (Finch TV v.1.4.0, Geospiza. Inc., ABD) vasıtasıyla değerlendirilerek; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> internet sitesindeki BLAST sunucu arayüzünden benzer dizilime sahip mayalar araştırılarak kültürler tanımlanmıştır.

3.3.5.3. Küf İzolatları İçin Kullanılan DNA Ekstraksiyonu ve PCR Metodu

Küf izolatlarının konvansiyonel PCR analizleri için THERMAL CYCLER (BIO-RAD, C-1000) kullanılmaktadır. PCR ürünlerinin miktarları ya da konsantrasyonları (ng/µl) sekans analizlerinden önce Nanodrop (8 kanallı, ThermoScientific, ABD) kullanılarak belirlenmekte, Maxi yatay elektroforez sistemi (EC340, 20x20 cm, ThermoScientific, ABD) kullanılmak suretiyle elde edilen jellerin görüntüleri ise jel görüntüleme sistemi (VERSADOC, 4000MP, BIO-RAD, ABD) ile sağlanmaktadır.

3.3.6. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Morfolojik ve Moleküler Testler

Proje kapsamında izole edilen mayaların tanımlama test sonuçlarının değerlendirilmesinde ise Lodder (1970), Deák (1995), McClary vd. (1959), Barnett vd. (2000), Kurtzman ve Fell (1998, 2000) tarafından belirlenen taksonomik anahtarlardan yararlanıldı. Maya izolatlarının tanımlanması boyama, katalaz testi, 15 ve 45°C'de gelişme, mikroskopta hücre morfolojisi, YM broth besiyerinde 30 °C'de 48 h gelişen hücre özelliklerinin incelenmesi, McClary's acetate agar medium besiyerinde maya sporulasyonu analizleri ve Dalmau plak tekniğiyle izolatların hif, yalancı hif, blastospor, klamidospore yapılarının incelenmesi suretiyle yapılmıştır.

3.3.6.1. Maya İzolatları İçin Kullanılan DNA Ekstraksiyonu ve PCR Metodu

Maya izolatları için Harju vd. (2004) tarafından kullanılan hızlı DNA İzolasyonu yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem göre uygulanan prosedür aşağıda verilmiştir:

1. Alınabildiği kadar fazla maya hücresi ependorf tüp içindeki 1 ml steril suda çözüldürülmüştür.
2. Hücreler 14800 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır.
3. Pellete 400 µl lizis buffer (%2 Triton X-100, %1 SDS, 100 mM NaCl, 10 mM TrisCl-ph 8.0, 1 mM EDTA-ph 8.0), cam boncuk, 250 µl fenol/kloroform/isoamil alkol ilave edilmiştir.

4. Karışım 5 dakika vorteks ile karıştırılmış, 30 saniye beklenmiş, 1 dakika daha karıştırılmış ve 14000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
5. Üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 100 µl kloroform eklenmiş ve 1 dakika vorteks ile karıştırılarak 14000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
6. Üst faz yeni bir tüpe aktarılmış üzerine 650 µl soğuk etanol eklenmiş ve ters çevirerek ya da düşük hızda vorteks ile karıştırılmıştır.
7. Karışım içinde DNA görülmüş ve 14000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
8. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra pellet vakumlu kurutucuda 30 dakika ya da havada 1 gece kurumaya bırakılmıştır.
9. Kuruyan pellet yaklaşık 40 µl TE (10 mM Tris-ph 8.0, 1 mM EDTA-ph 8.0) içinde çözüldürülerek -20 °C'de saklanmıştır.

3.3.6.2. Maya ve Küf İzolatları İçin Kullanılan DNA Dizi Analizi

Küf izolatlarının konvansiyonel PCR ürünlerinin sekans analizleri İYTE Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırmaları Merkezi (BİYOMER) laboratuvarlarında bulunan DNA sekans analiz cihazı (ABI 3130XL, 16 Kapillar Sistem, Applied Biosystems, ABD) kullanılarak yapılmakta sonuçlar BLAST analizi ile değerlendirilmiştir.

3.4. İstatistiksel Analizler

Kimyasal verilerin istatistiksel analizinde çok değişkenli, bir yöntem olan asal bileşenler analizi (PCA) kullanılmıştır. PCA, çok sayıda değişkenin olduğu durumlarda tercih edilen bir yöntemdir ve bu teknikle daha az sayıda ve asal bileşen adı verilen yapay değişkenler oluşturulur. Asal bileşenler ölçülen parametrelerin varyanslarının çoğunu bilgi olarak taşırlar.

Bu çalışmada çok değişkenli veri matrisi üç zeytin tipinden iki hasat sezonunda sekiz hafta boyunca toplanan örneklerin kimyasal ölçümlerini değişkenler olarak içerir. Bu veriler iki hasat sezonunu içerecek toplu veriler olarak veya zeytin tipleri arasındaki farkları daha iyi ortaya çıkarmak için tek tek sezonlar olarak kullanılmıştır. Veriler, PCA uygulanmadan önce otomatik olarak ölçeklenmiştir. Çok değişkenli analiz, SIMCA-P v.11.5 (Umetrics, Umea, İsveç) yazılımı ile yapılmıştır. PCA sonuçları skor ve yükleme grafikleri ile ifade edilmiştir. Skor grafikleri örnekler arasındaki gruplaşmayı gösterir. Yükleme grafikleri ise her değişkenin önemi hakkında fikir verir bundan dolayı yükleme grafikleri değişkenlerle örnekler arasındaki bağlantıyı ifade ederler.

Varyans analizi (ANOVA), grup averajlarının birbirleri arasındaki farkları analiz eden bir istatistiksel yöntemdir. Bu çalışmada da ANOVA, zeytin tipi (Hurma, Erkence ve Gemlik), hasat zamanı (1-8 hafta) ve hasat yılının (2011/12 ve 2012/13) pH, aw ve toplam fenol içeriği

üzerinde etkisini belirlemek için kullanılmıştır. Verilerin analizinde Minitab v.16 (State College, PA, ABD) kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

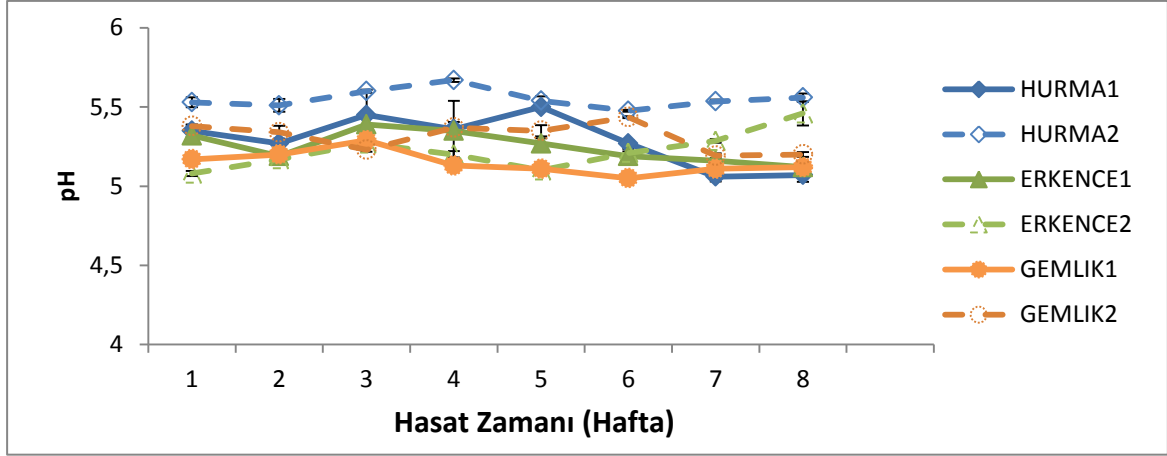
4.1. Kimyasal Karakterizasyon

Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinleri için 2011/12 ve 2012/13 yıllarına ait ve 8 haftalık örnekleme süreci boyunca olgunlaşma indisleri Tablo 2'de verilmiştir. İki hasat yılında da zeytin örnekleri Ekimden Aralığa kadar olan dönemde aynı bahçede bulunan aynı ağaçlardan toplanmıştır. Toplama zamanı, Hurma zeytinin hurmalanmamış Erkence'den görüntü olarak ayrıldığı dönemdir. Hurma bu dönemde koyu kahverengine dönmekte ve hafif buruşuk bir görüntü kazanmaktadır. Hurma'nın olgunlaşma indisi birinci sezonda 3,14-5,34 aralığında değişirken ikinci sezonda bu aralık 4,56-6,37'dir. Erkence olgunlaşma indisi, 2011/12'de 0,5-3,67 iken 2012/13'de 2,16-5,94 aralığında değişmiştir. Gemlik için olgunlaşma indisi, ilk yıl 1,1-5,88 değerleri arasında değişmekte iken ikinci yıl bu değer 2,19-4,16 aralığında olmuştur. Olgunlaşma indisi meyvelerin olgunlaşma derecesini gösterir. Bu çalışmada örnekler her seferinde zeytin ağacının bütün taraflarından toplanmıştır ve genellikle indis, zamanla artış göstermiştir. Ancak ağaçtaki zeytinlerin tümü aynı anda olgunlaşmamaktadır. Bu nedenle de bazı haftalarda olgunlaşma indisi dalgalı bir seyir izlemektedir.

Şekil 2 zeytin örneklerinin iki hasat yılında ve örnekleme sürecinde pH değerlerini göstermektedir. Hurma zeytin için pH değer aralıkları ilk ve ikinci yılda sırasıyla 5,06-5,5 ve 5,6-5,67 olmuştur. Erkence zeytini için pH aralığı ilk yılda 5,12-5,39 iken ikinci yıl bu değer 5,08-5,46'dır. Gemlik pH değerleri, ilk yıl 5,05-5,29 arasında değişirken ikinci yıl değişim 5,19-5,44 aralığındadır. Genel olarak 2011/12 hasat yılına ait pH değerlerinin bütün zeytin tipleri için 2012/13 yılına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Daha sonraki bölümlerde görüleceği üzere ilk yıl organik asit konsantrasyonları da ikinci yıla göre daha yüksektir.

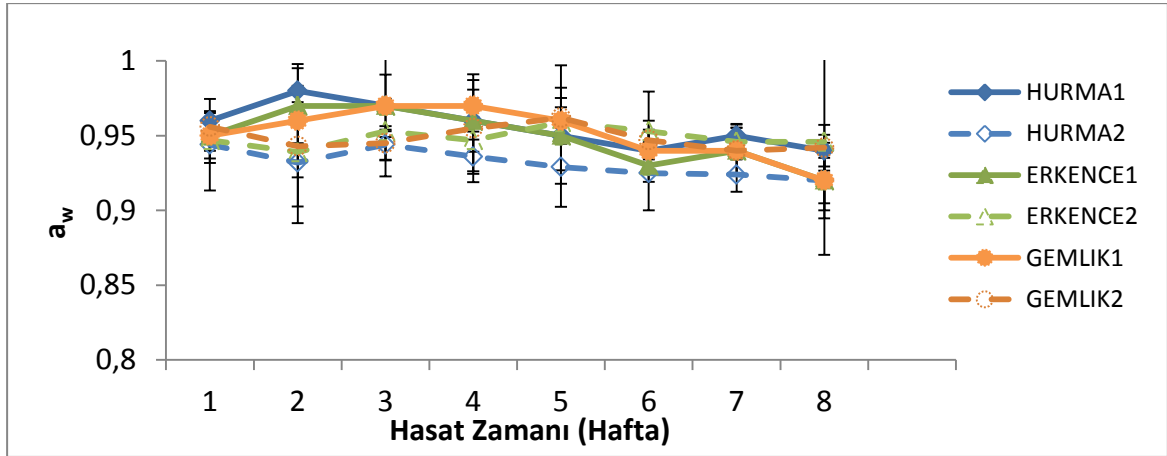
Tablo 2. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılında ve örnekleme sürecinde olgunlaşma indisleri

Zeytin tipi	Olgunlaşma İndisi	Zeytin tipi	Olgunlaşma indisi
<i>2011/12</i>		<i>2012/13</i>	
H11	3,9	H21	5,43
H12	4,1	H22	4,56
H13	5,34	H23	5,92
H14	4,95	H24	5,6
H15	3,74	H25	6,18
H16	4,37	H26	5,42
H17	3,99	H27	6,37
H18	3,94	H28	6
E11	0,5	E21	2,53
E12	1,27	E22	2,16
E13	2,25	E23	2,34
E14	1,65	E24	2,53
E15	1,69	E25	3,17
E16	3,65	E26	3,18
E17	3,56	E27	3,49
E18	3,67	E28	5,94
G12	1,1	G21	2,42
G13	1,38	G22	2,19
G14	2,41	G23	3,32
G15	2,1	G24	3,09
G16	3,65	G25	3,92
G17	4,82	G26	4,6
G18	5,88	G27	4,26
		G28	3,84



Şekil 2. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılında ve örnekleme sürecinde pH değerleri

İki hasat yılının örnekleme periyodunda zeytin örneklerinin a_w değerleri Şekil 3'de görülebilir. Hurma zeytininin a_w değerleri, 2011/12 yılında 0,94-0,98 aralığında değişirken bu değer, 2012/13'de 0,92-0,94 aralığında olmuştur. 2011/12 Erkence örneklerinin a_w değerleri 0,92-0,97 iken 2012/13'de a_w değerleri bu zeytin için 0,94-0,96 arasındadır. Gemlik tipi zeytinde ilk hasat yılı a_w aralığı 0,92-0,97 ve ikinci yıl bu aralık 0,94-0,96'dır.



Şekil 3. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılında ve örnekleme sürecinde a_w değerleri

Zeytin tipi, hasat zamanı ve hasat sezonunun pH ve a_w üzerine etkilerini incelemek için veriler ANOVA ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu analiz için faktörler, hasat yılı (2011/12 ve 2012/13), zeytin tipi (Hurma, Erkence ve Gemlik) ve hasat zamanı (8 hafta) ve değişkenler ise pH ve a_w değerleridir. ANOVA'ya göre (Tablo 3) pH için bütün faktörler ve

onların etkileşimleri için p değerleri 10^{-3} 'den küçük ve model R^2 'leri %95,4'den büyük olduğundan dolayı önemlidir. Bu analiz için modelin normalitesinde bir problem görülmemektedir ve herhangi bir aykırı değere rastlanmamıştır (grafikler gösterilmemiştir). Bu sonuç, zeytin örneklerinin pH değerlerinin zeytin tipi, hasat zamanı ve sezonundan ve bunların etkileşimlerinden etkilendiği anlamına gelmektedir.

Tablo 3. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin pH verileri için ANOVA tablosu

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Zeytin tipi	2	1,105276	1,105276	0,552683	304,55	0,00
Hasat yılı	1	0,592900	0,592900	0,592900	326,74	0,00
Hasat zamanı	7	0,286100	0,286100	0,040871	22,52	0,00
Z. tipi*H. yılı	2	0,545113	0,545113	0,272556	150,20	0,00
Z. tipi*H. zamanı	14	0,275512	0,275512	0,019679	10,85	0,00
H. yılı*H. zamanı	7	0,356889	0,019679	0,050984	28,10	0,00
Z. tipi*H. yılı*H. zamanı	14	0,479165	0,050984	0,034226	18,86	0,00
Hata	96	0,174200	0,034226	0,001815		
Toplam	143	3,815156	0,001815			

ANOVA sonuçlarına göre zeytin tipi, hasat zamanı ve sezonu ayrıca bu ana faktörlerin zeytintipi*hasatyılı*hasatzamanı dışındaki bütün etkileşimleri zeytinlerin a_w değişiminde önemlidir (Tablo 4). ANOVA modeli R^2 değeri %91,7'dir ve modelin normalitesinde bir problem olmadığı gibi aykırı değerlere de rastlanmamıştır.

Tablo 4. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin a_w verileri için ANOVA tablosu

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Zeytin tipi	2	0,0016822	0,0016822	0,0008411	11,57	0,00
Hasat yılı	1	0,0053900	0,0053900	0,0053900	74,14	0,00
Hasat zamanı	7	0,0101355	0,0101355	0,0014479	19,92	0,00
Z. tipi*H. yılı	2	0,0037776	0,0037776	0,0018888	25,98	0,00
Z. tipi*H. zamanı	14	0,0020619	0,0020619	0,0001473	2,03	0,00
H. yılı*H. zamanı	7	0,0059718	0,0059718	0,0008531	11,73	0,00
Z.tipi*H. yılı*H. zamanı	14	0,0015507	0,0015507	0,0001108	1,52	0,117
Hata	96	0,0069793	0,0069793	0,0000727		
Toplam	143	0,037492				

4.1.1. Zeytinlerin Şeker İçerikleri

Glukoz, fruktoz, sukroz, manoz ve manitol, zeytin örneklerinde tespit edilen şeker ve şeker alkolleridir. Üç zeytin tipi için bu şekerlerin konsantrasyonları, hasat zamanı ve yılına göre Tablo 5'de listelenmiştir.

İlk hasat yılında tatlı Dhokar tipi zeytinde olduğu gibi glukoz ve manitol baskın şekerler olarak belirlenmiştir (Jemai vd., 2009). Sukroz, Hurma zeytinde ikinci haftadan sonra kaybolmuştur. Aynı zamanlarda fruktoz ve glukoz konsantrasyonları artmıştır; bu da sukrozun glukoz ve fruktoza dönüştüğü şeklinde yorumlanabilir. İlk hasat yılında bütün zeytin tipleri için manitol dışındaki şekerlerde örneklemenin son üç haftasında artış görülmüştür. Manitle ise beşinci haftadan sonra rastlanmamıştır.

İlk hasat yılında en yüksek glukoz konsantrasyonu Hurma zeytininde görülmüştür ve konsantrasyon 21.256-296.787,05 mg/kg aralığında değişmektedir. Erkence'de ise glukoz içeriği 30.700-163.449,44 mg/kg olarak değişmekte iken bu şeker Gemlik tipi zeytinde 39.160-88.883,15 mg/kg konsantrasyon aralığındadır. Dhokar zeytini için glukoz başlıca şeker olarak 40.830 mg/kg konsantrasyonunda belirlenmiş ve bunu miktar olarak fruktoz takip etmiştir. Bu şekerlerin konsantrasyonları aynı yörede yetişen ve dalında tatlılaşmayan bir zeytin tipine göre daha yüksektir (Rigane vd., 2011).

İlk hasat yılında manitol en düşük seviyede Gemlik tipi zeytinde bulunmuştur ve konsantrasyon 7.360-30.500 mg/kg aralığında tespit edilmiştir. Erkence zeytini ise ilk yılda en yüksek manitol seviyesine (4.368,3-18.971,63 mg/kg) sahiptir. Dhokar zeytininde manitol 79.800 mg/kg seviyelerinde iken Hurma'da konsantrasyon 11.681,49 mg/kg düzeyinde olup Dhokar'ın aksine lineer bir artış göstermemiştir (Jemai vd., 2009).

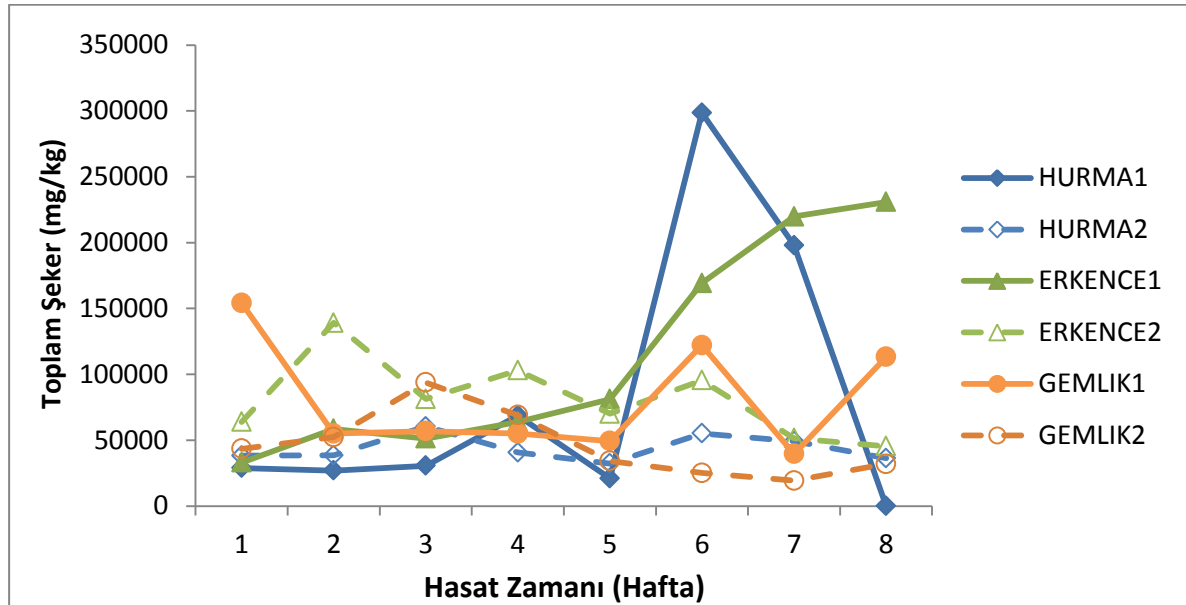
Tablo 5. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde şeker profilleri (mg/kg)

Zeytin Tipi	Glukoz	Fruktoz	Sukroz	Manoz	Manitol	Zeytin Tipi	Glukoz	Fruktoz	Sukroz	Manoz	Manitol
2011/12						2012/13					
H11	21256	te	3371,2	te	4227,2	H21	8009,5	11036,1	5631,4	4997,8	8556,3
H12	20546,1	te	2156,9	1291,7	2942,6	H22	18828,3	7047,2	5709,6	3361,8	3534,6
H13	21859,1	1785,3	te	1124,6	5770,7	H23	23122,9	13137,2	4955,6	4411,9	14748,4
H14	46305,5	5780,1	te	5000,2	11681,4	H24	12879	9475,9	5426,9	3598,3	9259,4
H15	14399,7	2003,7	te	te	4564,4	H25	13378,5	7569,4	3223,6	te	8083,4
H16	296787	1723,7	te	te	te	H26	20619	14885,5	6177,3	2587,4	10851,1
H17	197919,6	te	te	te	te	H27	14663,8	15827,6	5409,9	2333,7	10934,9
H18	118058,6	4180,3	te	te	te	H28	11677,4	9690	3861,6	3682,4	7348,5
E11	19364,4	te	4284,4	5026,7	4386,3	E21	13457,7	24904,3	9172,2	6530,9	9817,1
E12	26777,4	5385,4	4573,1	2838,8	18971,6	E22	53439,2	33284,2	8037,5	21459	22882,4
E13	30700	5780,1	5070	1729,6	7970	E23	33454	15464,9	16040	1278	14962,4
E14	42440	3220	4580	2700	10990	E24	13218,9	50872,3	16287,2	te	22627,9
E15	41400	5960	14110	5590	14110	E25	23352,1	15889,8	3541,4	23714	3541,4
E16	135115,6	7148,5	26978,6	te	te	E26	38161,4	31263,9	5542,1	2847,7	17594,4
E17	163449,4	7743,52	32613,5	15953,9	te	E27	21440,4	11363,6	7001,1	2099,7	6545,7
E18	153751,4	12382,1	50059,9	14654,3	te	E28	19500,6	11075,2	4390,9	2797,7	7680,7
G12	35620	5740	4950	te	8740	G21	13163,6	13858,9	8365,7	te	6058,6
G13	39160	4351	4580	1321,8	7360	G22	18368,6	16477,9	6061,7	6711,7	4778,4
G14	33333,8	4530	2720	4770	9700	G23	29216,1	16478,1	23581,6	14742	9737,2
G15	40160	6890	te	te	9110	G24	30741,3	19786	6616,7	te	11853,9
G16	88883,1	15346,7	9313,7	8483	te	G25	8933	14465,7	4693	1970,8	4103,9
G17	33807,8	te	5768	te	te	G26	8628,5	5946,4	3575,7	2714,3	4274,3
G18	73598,3	5624	21733,5	12260,7	te	G27	4701,8	6109,9	3379,2	1467,7	3587,8
						G28	11118,7	12205,6	2383	1643	4609,4

te: tespit edilemedi

İlk hasat yılının aksine ikinci yılda sukroz bütün örnekleme sürecinde tespit edilmiş ve manitol beşinci haftadan sonra kaybolmamıştır. Zeytinlerin manoz konsantrasyonları da ilk yıla göre daha yüksektir. İkinci yıl glukozun en yüksek seviyede olduğu zeytin tipi Erkence'dir (13.218,97-53.439,29 mg/kg). Glukoza benzer şekilde fruktoz da 11.075,2-50.872,33 mg/kg aralığında Erkence'de en yüksek düzeydedir. Birinci yılda olduğu gibi ikinci yılda da en düşük manitol düzeyi (3.587,83-11.853,94 mg/kg) Gemlik için tespit edilmiştir.

Bu çalışmada incelenen üç zeytin tipinin toplam şeker miktarını hasat zamanına bağlı olarak gösteren grafik Şekil 4'de verilmiştir. Toplam şeker miktarı, ilk sezonun son üç haftasında önemli ölçüde artmıştır. Genel olarak bakıldığında belli bir eğilimden çok iki hasat yılında haftalara bağlı olarak inişler ve çıkışlar gözlenmiştir. Bu inişli çıkışlı grafik şekerin olgunlaşma sırasında ihtiyaca bağlı olarak devamlı üretilmesi ve yağ asidi sentezinde kullanılması ile ilişkilendirilmiştir (Menz ve Vriesekoop, 2010). Bazı çalışmalarda olgunlaşma sırasında toplam şekerin düştüğünü bildirmesine rağmen (Nergiz ve Engez, 2000; Ergönül ve Nergiz, 2010; Menz ve Vriesekoop, 2010) Tunus'un Chemlali ve Dhokar çeşitlerinde toplam şeker miktarında zamanla artış gözlenmiştir (Jemai vd., 2009).

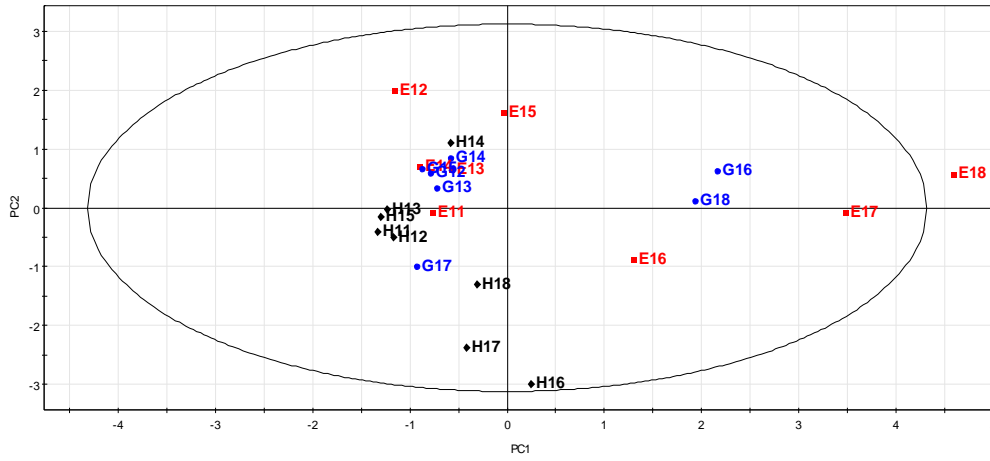


Şekil 4. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde toplam şeker miktarları

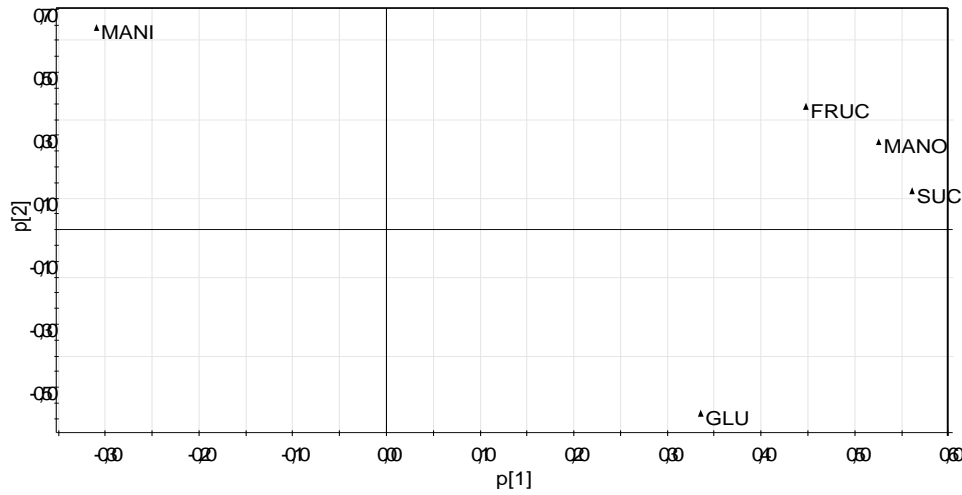
Zeytin örneklerinin şeker profili ve zeytin tipi, hasat zamanı ve hasat sezonu parametreleri arasındaki bağlantıyı istatistiksel olarak incelemek amacı ile asal bileşenler analizi (PCA) kullanılmıştır. PCA hem tek tek yıl bazında hem de iki yılı da kapsayan bütün veriler için uygulanmıştır.

İlk hasat yılı için kullanılan PCA modeli 2 asal bileşenden oluşmaktadır ve modelin R^2 değeri 0,78'dir. Bu modelin skor grafiğine (Şekil 5a) göre ilk beş haftanın örnekleri bir arada toplanmıştır ve zeytin tipine göre bir farklılaşma görülmemiştir. Ancak Hurma zeytinin son üç hafta örnekleri alt sol dördünde, Gemlik örnekleri ise grafiğin üst sol tarafında yer almıştır. Aynı döneme ait Erkence örnekleri ise Gemlik tipine daha yakın bir konumdadır ve Hurma'dan iyice ayrılmışlardır. Yükleme (loading plot) grafiğine (Şekil 5b) göre ilk beş haftanın diğerlerinden ayrılmasına neden olan şeker, ilk hasat yılında beşinci haftadan sonra tespit edilemeyen manitoldur. En yüksek konsantrasyonuna altıncı haftada ulaşan glukoz, Hurma için ayrıştırıcı bir şeker olarak görünmektedir. Fruktoz, manoz ve sukroz ise Gemlik ve Erkence'yi son üç haftada Hurma'dan ayıran parametrelerdir.

a)

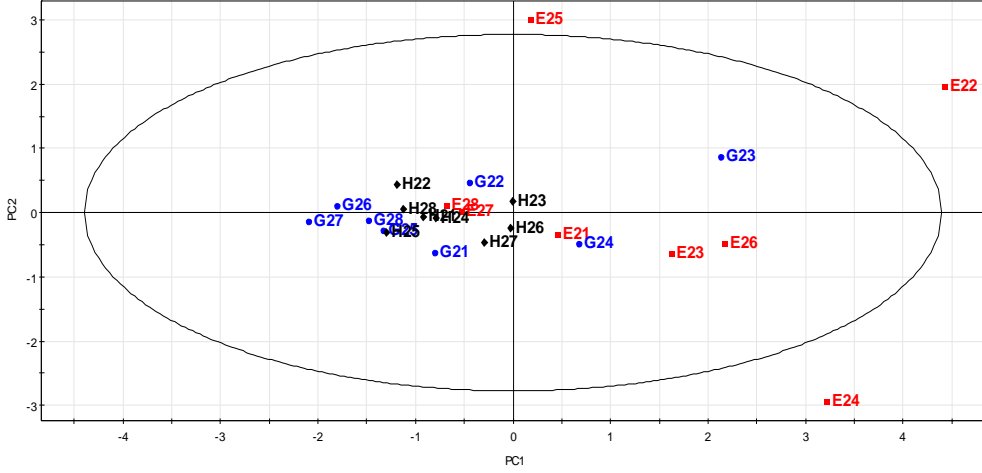


b)



Şekil 5. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait şeker profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri

İkinci hasat yılı için oluşturulan PCA modeli 4 bileşenden oluşmaktadır ve R^2 değeri 0,98'dir. Skor grafiğinden (Şekil 6) görüleceği üzere ikinci yıl şeker profili zeytin tipine veya hasat zamanına bağlı olarak herhangi bir ayrım sağlamamıştır.

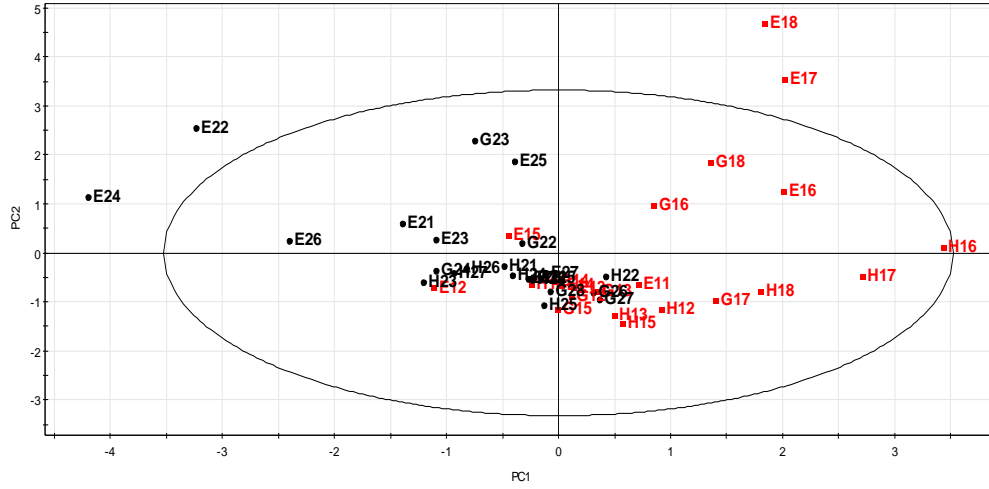


Şekil 6. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait şeker profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin skor grafiği

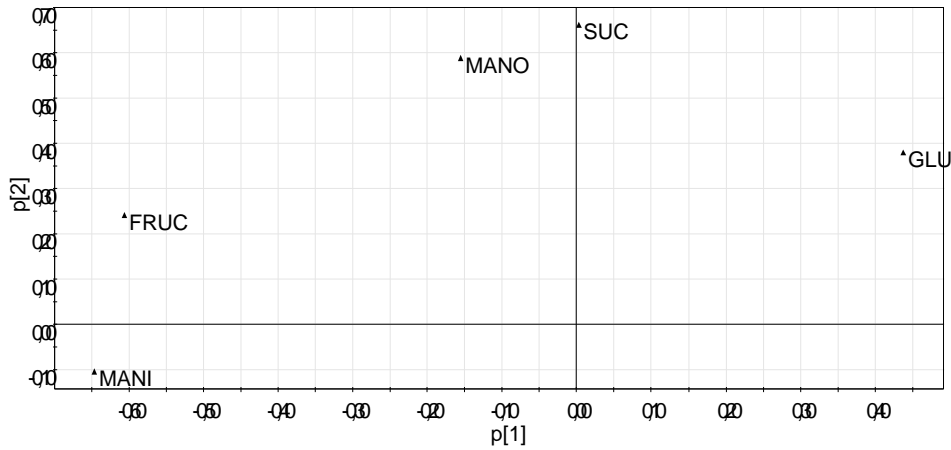
İki yıllık şeker verileri ile oluşturulan PCA modelinin 2 bileşeni vardır ve R^2 değeri 0,72'dir. Bu model için oluşturulan skor grafiğine göre şeker profili kullanıldığında bazı örnekler kendi sınıfları arasında olmamakla beraber hasat sezonları arasında bir ayrım görülmektedir (Şekil 7a). İlk hasat yılı örnekleri grafiğin sağ tarafında yer alırken ikinci yıl örnekleri genel olarak soldadır. Yükleme grafiğine (Şekil 7b) göre sukroz ve glukoz ilk yıl ayırımına neden olan şekerlerdir. Sukroz ilk yıl daha düşük konsantrasyonlardadır ve ikinci yıl ayırımının sebebi manitol, fruktoz ve manoz ise ikinci yıl örneklerinde örnekleme periyodunda daha düzenli bir şekilde dağılım göstermişlerdir.

Sonuç olarak şeker profilinin zeytin tipine göre bir ayrım sağlamadığı ancak hasat yılında ayırma neden olduğu görülmüştür.

a)



b)



Şekil 7. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait şeker profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri

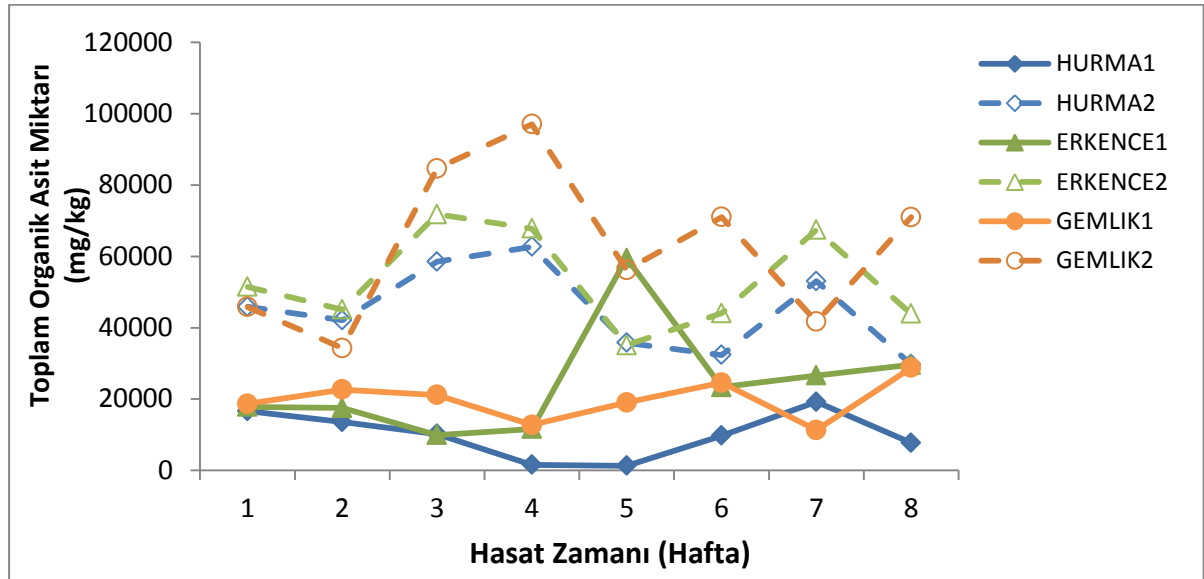
4.1.2. Zeytinlerin Organik Asit İçerikleri

Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 ve 2012/13 hasat yıllarının sekiz haftalık örnekleme periyoduna ait organik asit içerikleri Tablo 6'da verilmiştir. İki hasat yılı için de başlıca organik asit sitrik asittir. Sitrik asidin yanı sıra malik ve suksinik asitte zeytin örneklerinde tespit edilmiştir. Laktik asit sadece Gemlik tipi zeytinde ikinci hasat yılının son haftalarında görülmüştür.

Gemlik tipi zeytinde ilk hasat yılında sitrik asit yüksek konsantrasyonlarda (6907-16412 mg/kg) tespit edilmiştir. Türk zeytinleri ile ilgili bir çalışmada başlıca organik asitin malik asit olduğu bildirilirken (Ergönül ve Nergiz, 2010) başka bir çalışmada ise Türkiye'nin değişik yerlerinde yetişen zeytinlerde sitrik asitin ve onu takiben de suksinik asitin önemli

organik asitler olduğu rapor edilmiştir (Arslan ve Özcan, 2011). Hurma zeytininde malik asit, ilk altı hafta bulunamamasına rağmen bu haftadan sonra konsantrasyon yükselerek son haftada en yüksek değerine (6390,7 mg/kg) ulaşmıştır. Suksinik asit, Hurma'da beşinci haftadan sonra tespit edilememiştir. En yüksek suksinik asit seviyesi (47636 mg/kg) Erkence'dedir. Asetik asit sadece Hurma zeytininde gözlenmiştir ancak beşinci haftadan sonra kaybolmuştur.

İkinci hasat yılında hemen hemen bütün organik asitler ilk yıla göre daha yüksek konsantrasyonlardadır. İlk yılda olduğu gibi, 26.055,9-86.098,7 mg/kg konsantrasyonu ile Gemlik en yüksek sitrik asit içeriğine sahip olan zeytindir. İlk yılın aksine malik asit bütün örnekleme sürecinde tespit edilmiştir ve bu organik asit Erkence'de daha yüksek (4.583,79-12.935,2 mg/kg) düzeydedir. İkinci yıl Erkence zeytininde suksinik asit görülmemiştir. Buna ek olarak Hurma zeytininde de bu organik asit beşinci haftadan sonra yok olmuştur. Hasat yıllarına göre bütün zeytinler için toplam organik asit miktarları Şekil 8'de gösterilmiştir. Grafikten görüleceği üzere ikinci senenin toplam organik asit miktarları tüm zeytinler için genel olarak ilk yıla göre daha yüksektir.



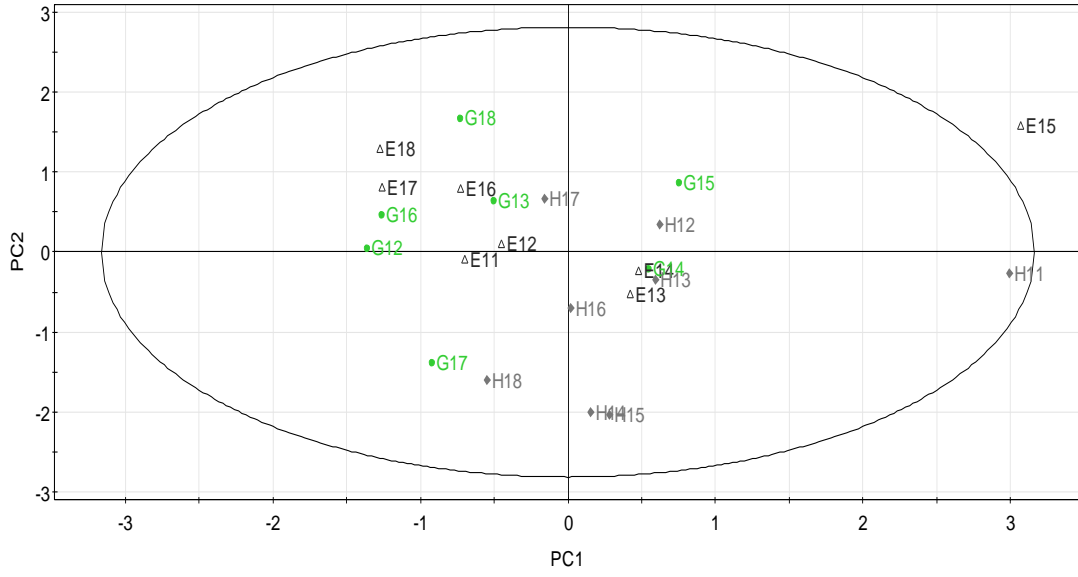
Şekil 8. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde toplam şeker miktarları

Organik asit verilerini zeytin tipi, hasat zamanı ve hasat yılına göre değerlendirmek amacı ile PCA kullanılmıştır. İlk hasat yılı organik asit verileri ile oluşturulan PCA modeli için 4 asal bileşen kullanılmıştır ve R^2 değeri, bu model için 0,99'dur. Şekil 9'daki skor grafiğinden görüleceği üzere ilk hasat yılında zeytin tipine veya hasat zamanına bağlı olarak bir ayırım görülmemiştir.

Tablo 6. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde organik asit profilleri (mg/kg)

Zeytin Tipi	Sitrik A.	Malik A.	Suksinik A.	Laktik A.	Asetik A.	Zeytin Tipi	Sitrik A.	Malik A.	Suksinik A.	Laktik A.	Asetik A.
<i>2011/12</i>						<i>2012/13</i>					
H11	11546,2	te	3644,1	690,6	743,7	H21	34306,5	9651,3	1873	te	te
H12	13402	te	103,4	te	39,3	H22	32140	7702,1	2223,1	te	te
H13	9859,4	te	288,3	te	59,4	H23	46080,7	9644,5	2780	te	te
H14	1170,4	te	403,6	te	te	H24	52511,7	5168,4	837,6	1989,4	2171,4
H15	1134,8	te	148,8	te	462,6	H25	27357,3	3549,5	1030,8	1850,7	1952,7
H16	7087,4	2655,4	te	te	te	H26	27252,1	5088,2	te	te	te
H17	13145,2	6055,1	te	te	te	H27	41919,8	11129,5	te	te	te
H18	1343,9	6390,7	te	te	te	H28	23880,6	5519,2	373,7	te	te
E11	8113,6	9701,5	te	te	te	E21	38514,9	12935,2	te	te	te
E12	9715,7	7778,3	te	te	te	E22	34925,3	10146,7	te	te	te
E13	8644,4	te	1300,4	te	te	E23	62574,9	9191,8	te	te	te
E14	10036	te	1612,1	te	te	E24	58357,9	9424,4	te	te	te
E15	11872,4	te	47636,7	te	te	E25	30521,5	4583,7	te	te	te
E16	12240,1	11077,6	te	te	te	E26	36880,2	7183,5	te	te	te
E17	10932,4	15701,1	te	te	te	E27	33711,4	33711,4	te	te	te
E18	13185,9	16432,8	te	te	te	E28	39251,7	4666,8	te	te	te
G12	7071,6	15594,1	te	te	te	G21	39145,1	6669,5	te	te	te
G13	12143,4	8996,2	te	te	te	G22	26055,8	8243,2	te	te	te
G14	10091,8	te	2663,6	te	te	G23	73957,7	10667,3	te	1931,4	te
G15	15489	te	3541,3	te	te	G24	86098,6	9515,3	te	1392,2	te
G16	9294,5	15279,3	te	te	te	G25	47637	7500,6	te	1020,2	te
G17	1387,6	9938,1	te	te	te	G26	58393,2	6454,433	1424,2	2234,4	2526,6
G18	16412,8	12338,8	te	te	te	G27	33768,1	5164803	1548,9	1182,5	te
						G28	64755	4366,9	1837	te	te

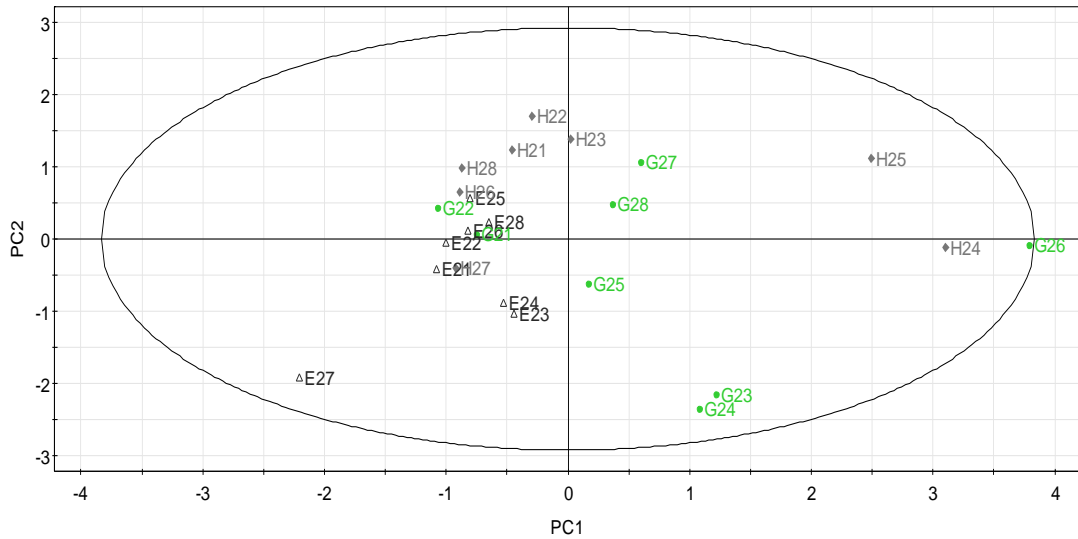
te: tespit edilemedi



SIMCA-P 10.5 - 12.08.2013 17:16:27

Şekil 9. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait organik asit profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin skor grafiği

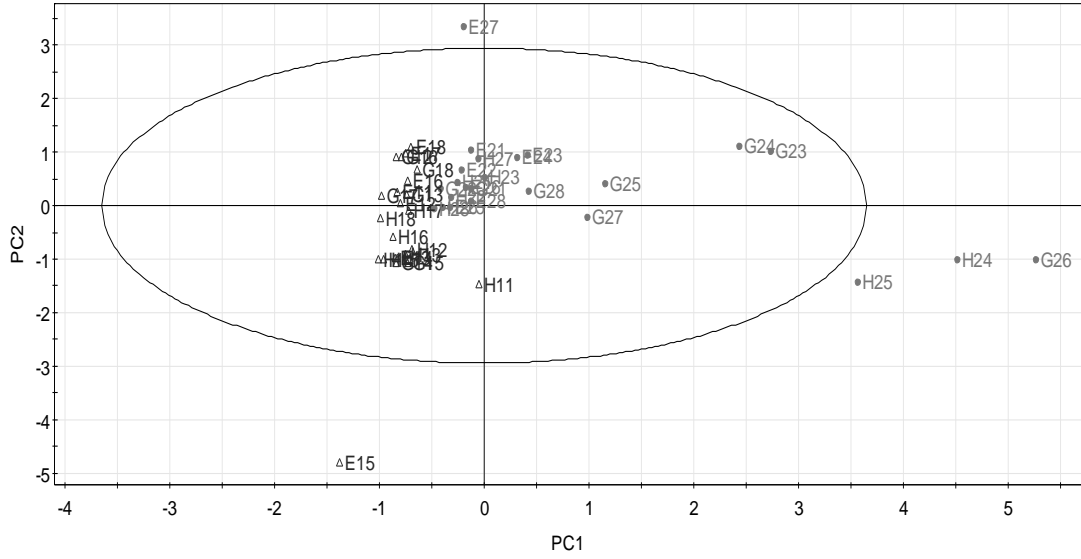
İkinci yıl organik asit verileri için PCA modeli 4 bileşenli ve 0,99 R^2 değerine sahiptir. Skor grafiğine (Şekil 10) göre ikinci yıl için de yine organik asit profili zeytin tipi veya hasat zamanına göre bir ayrışmaya yol açmamıştır.



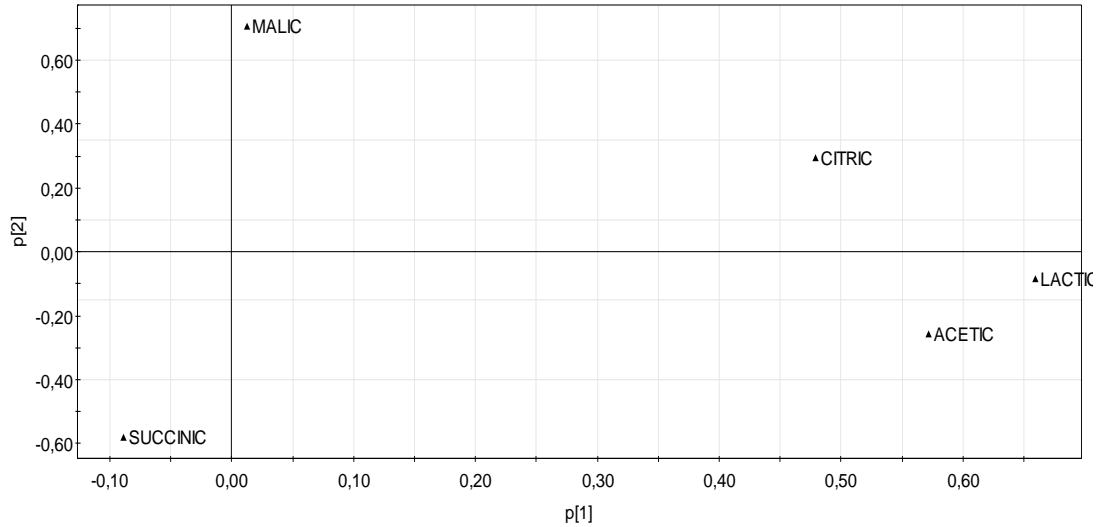
SIMCA-P 10.5 - 12.08.2013 17:23:12

Şekil 10. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2012/13 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait organik asit profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin skor grafiği

a)



b)



Şekil 11. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait organik asit profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri

Son olarak iki yıl organik asit verileri birlikte kullanılarak 4 bileşenli R^2 değeri 0,99 olan bir model oluşturulmuştur. Skor grafiğine (Şekil 11a) göre hasat yılına (2011/12 ve 2012/13) göre iyi bir ayırım görülmüştür. İlk yıla ait örneklerin çoğu grafiğin sol tarafında yer almıştır. İlk yıl örnekleri daha birbirine yakın dururken ikinci yıla ait örnekleri grafik üzerine daha geniş bir şekilde yayılmıştır. Başka bir çalışmada yine organik asit konsantrasyonunun Türk

zeytinlerinin hasat yılı bazında ayırma neden olduğu bildirilmiştir (Arslan ve Özcan, 2011). Yükleme grafiğine (Şekil 11b) göre malik ve suksinik asitler ilk yıl için farklılaştırıcı parametrelerdir. Malik asit ikinci yıl bütün örnekleme periyodunda tespit edilmişken ilk yıl zeytin tipine bağlı olarak haftalar arası var-yok şeklinde bir profil izlemiştir. Sonuç olarak organik asit profili zeytin tipi açısından bir farklılık göstermezken hasat yılı ayırışmayı sağlayan önemli bir parametredir.

4.1.3. Zeytinlerin Toplam Fenol İçerikleri

Üç zeytin tipinin toplam fenol içerikleri Tablo 7 ve 8'de listelenmiştir. Erkence tipi zeytinin toplam fenol içeriği 2011/12 hasat yılında 504,7-1.230,4 mg GAE/100g aralığındayken 2012/13 yılında aynı değer 335,9-664,8 mg GAE/100 g'dır. Hurma için aynı değerler ilk yıl 337,7-649,6 mg GAE/100g ve ikinci yıl 29,2-468,2 mg GAE/100g aralığında değişmiştir. Gemlik için ise toplam fenol içeriği 2011/12 ve 2012/13 yıllarında sırası ile 416,8-701,9 mg GAE/100g ve 103,2-452,4 mg GAE/100g olmuştur. Genel olarak iki hasat yılında da Erkence en yüksek toplam fenol içeriğine sahip olan zeytin iken Hurma aynı varyeteden olmasına rağmen en düşük toplam fenolü içerir. Bu iki tip arasında toplam fenol içeriğindeki fark doğal tatlılaşma işleminden kaynaklanmaktadır. Tunus'a has dalında tatlışan Dhokar zeytini de (508-768 mg GAE/100g) aynı bölgede yetişen normal bir zeytin türüne (508-768 mg GAE/100g) göre daha düşük seviyede toplam fenol içermektedir (Jemai vd., 2009) ve araştırmacılar Dhokar'ın düşük fenol içeriğini bu zeytinin tatlı karakterine atfetmişlerdir.

Olgunlaşma sürecinde toplam fenol içeriği haftalara göre inişli çıkışlı bir grafik sergilemiştir. Genellikle ikinci ile beşinci hafta arasında bir düşüş varken bundan sonraki haftalarda artış olmuştur. Bu inişli çıkışlı süreç başka çalışmalarda da gözlenmiştir (Morello vd., 2004).

Tablo 7. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde toplam fenol içeriği (mg/100 g) ve fenol profilleri (mg/kg)

Zeytin tipi	TPC	OLE	HYT	TY	API	VER	RTN	L-7-Glu	LTLN	QUE	o-cou	p-cou	FA	VA	CA	VN
H11	560,40	527,63	2013,44	17,49	10264,62	517,20	9,571	709,97	36,36	18,6	61,41	0,59	te	2,16	2,4	0,79
H12	649,64	786,15	2722,70	36,90	1022,18	66,37	12,99	84,071	34,20	23,2	118,9	0,70	0,56	3,01	2,37	1,61
H13	523,26	1166,89	1424,46	18,68	297,04	54,05	10,03	128,85	te	35,12	122,78	1,05	te	2,06	3,87	te
H14	412,68	87,701	3357,91	11,56	1727,42	81,92	te	123,80	4,98	te	126,61	te	0,81	3,03	te	1,88
H15	337,68	te	827,59	te	377,30	57,20	te	7,49	te	te	te	5,09	te	3,49	4,44	te
H16	533,97	103,71	1602,36	52,51	15502,65	519,73	9,56	189,07	72,98	35,96	16,09	1,99	231,72	5,74	1,65	4,57
H17	579,68	753,07	4104,61	73,10	8003,25	1995,76	21,21	334,76	te	50,40	23,34	3,86	282,28	10,72	2,14	4,27
H18	644,63	241,91	3239,12	32,53	5561,70	391,08	24,88	532,48	te	47,51	47,82	3,08	te	9,41	te	2,29
E11	518,43	1388,21	1001,16	14,94	3993,86	258,75	12,23	167,92	69,50	26,18	103,98	te	te	te	2,98	te
E12	518,02	1265,98	1627,43	24,19	1270,94	31,024	13,75	141,59	98,41	27,66	170,52	1,45	te	4,93	3,03	te
E13	526,22	625,70	2222,26	30,42	1391,48	39,24	59,50	63,43	te	33,73	12,51	te	te	11,52	2,85	te
E14	520,95	137,99	497,86	0,94	990,58	14,52	te	22,13	109,30	17,56	te	te	te	3,43	1,48	te
E15	504,69	470,90	471,66	11,03	1673,20	40,32	13,13	56,83	95,02	12,54	30,48	2,91	te	3,63	2,11	te
E16	900,69	329,34	2011,45	29,03	15454,53	312,87	14,99	1387,22	168,42	37,88	74,07	1,9	te	te	1,41	2,07
E17	691,32	608,61	1281,41	19,14	9804,94	566,54	29,23	1833,21	351,19	95,63	143,82	2,3	te	2,61	2,7	2,17
E18	1230,4	705,14	876,30	12,36	4443,14	424,94	29,53	2207,42	252,29	63,11	203,62	2,85	te	1,5	2,12	1,74
G12	544,61	4786,76	3070,73	te	4788,42	594,30	te	78,70	te	te	135,07	te	te	te	te	te
G13	452,33	2057,32	5399,42	te	2030,05	700,34	56,84	239,38	154,24	te	111,69	te	4,33	te	te	te
G14	637,10	294,53	6596,22	te	1835,13	66,63	24,77	133,99	171,68	te	107,23	te	5,63	7,95	te	11,5
G15	416,78	te	2277,51	te	2704,81	35,45	0,16	85,43	167,16	te	31,67	1,19	0,87	5,14	te	te
G16	806,88	683,95	3803,16	17,36	24689,41	473,78	22,11	619,82	298,15	152,08	132,75	4,39	te	3,66	te	2,13
G17	524,48	237,300	3704,21	6,99	22139,33	689,24	19,59	957,05	128,93	30,9	112,54	3,24	te	2,37	1,53	1,07
G18	701,84	307,42	8183,35	17,09	31838,78	1942,04	74,96	1081,14	te	te	116,46	7,24	te	te	9,53	te

TPC: toplam fenol içeriği, OLE: oleuropein, HYT: hidroksityrosol, TY: tyrosol, API:apigenin, VER: verbaskozit, RTN:rutin, L-7-Glu:luteolin-7-glukozit, LTLN:luteolin, QUE:kuersetin-3-glukozit, o-cou:o-kumarik asit, p-cou:p-kumarik asit, FA: ferulik asit, VA:vanilik asit, CA:kafeik asit, VN:vanillin.

Tablo 8. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin 2012/13 hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde toplam fenol içeriği (mg/100 g) ve fenol profilleri (mg/kg)

Zeytin tipi	TPC	OLE	HYT	TY	API	VER	RTN	L-7-Glu	LTLN	QUE	o-cou	p-cou	FA	VA	CA	VN
H21	208,36	780,76	61,83	te	1251,18	76,7	33,64	22,28	te	te	8,26	te	12,02	11,03	te	te
H22	344,34	190,94	22,55	te	539,02	10,81	28,9	7,87	te	te	3,13	te	te	5,03	te	0,43
H23	73,89	60,28	33,39	te	378,71	te	te	9,56	te	te	0,84	0,32	5,1	te	te	te
H24	29,21	291,09	105,61	7,55	906,06	39,89	7,78	39,28	te	te	1,09	1,02	2,96	te	4,41	te
H25	245,56	te	29,5	te	552,43	te	3,53	9,06	te	te	te	te	te	te	0,02	te
H26	152,11	te	te	te	te	te	te	te	te	te	te	te	te	te	te	te
H27	160,95	145,34	75,34	5,54	585,26	17,17	8,57	65,29	te	te	0,76	0,21	6,14	6,49	1,15	te
H28	159,09	17,9	7,17	te	714,23	te	te	te	te	te	te	te	te	3,52	te	te
E21	335,88	1490,37	101,51	10,95	929,82	29,91	61,84	21,73	1,03	te	9,45	0,49	4,63	9,03	te	1,14
E22	359,17	505,48	126,92	13,19	1229,2	34,77	21,19	46,06	0,95	te	6,56	0,27	4,18	3,5	te	te
E23	535,66	431,9	116,45	13,17	1641,2	16,75	15,14	54,24	2,76	te	0,42	2,34	5,03	2,93	5,02	te
E24	518,32	307,2	123,31	10,83	1412,5	43,73	19,95	34,26	1,19	te	te	7,85	6,66	3,51	2,64	0,43
E25	519,82	126,38	24,11	1,78	946,92	19,16	11,85	12,45	0,64	te	0,49	2,91	1,7	2	1,84	te
E26	347,00	334,58	78,58	24,7	1222,1	75,16	17,15	25,99	13,32	te	1,73	1,60	11,01	78,58	2,39	1,38
E27	664,81	139,11	79,39	5,12	920,2	11,07	8,11	39,07	te	te	5,97	3,77	1,99	2,05	1	0,15
E28	514,07	58,66	97,33	28,03	1211,1	80,42	30,28	21,33	56,23	te	8,02	0,36	8,37	2,43	1,89	te
G21	343,29	242,32	118,05	7,53	634,36	88,57	34,76	13,55	39,22	te	6,54	0,45	14,73	3,96	te	0,41
G22	411,37	751,48	484,79	10,07	1615,7	160,85	22,32	90,50	te	te	2,66	0,93	33,11	1,95	te	te
G23	244,92	166,65	427,43	te	981,71	47,1	12,75	37,64	1,33	te	0,91	0,38	8,06	2,12	2,12	te
G24	229,63	280,47	616,73	5,66	1420,9	194,56	24,62	28,68	te	te	1,84	0,69	10,05	2,38	te	0,07
G25	242,80	456,82	346,14	8,42	888,65	110,62	15,09	41,79	te	te	te	0,66	15,53	4,31	te	0,61
G26	103,19	163,24	374,06	2,65	694,54	37,16	6,51	22,31	te	te	0,72	0,19	15,93	8,18	te	te
G27	452,36	385,87	424,92	5,65	838,93	105	10,78	49,94	te	te	3,91	0,33	8,13	3,04	te	0,53
G28	228,39	290,94	288,62	te	701,73	37,6	4,14	8,14	te	te	te	0,5	4,14	te	te	te

TPC: toplam fenol içeriği, OLE: oleuropein, HYT: hidroksityrosol, TY: tyrosol, API:apigenin, VER: verbaskozit, RTN:rutin, L-7-Glu:luteolin-7-glukozit, LTLN:luteolin, QUE:kuersetin-3-glukozit, o-cou:o-kumarik asit, p-cou:p-kumarik asit, FA: ferulik asit, VA:vanilik asit, CA:kafeik asit, VN:vanillin.

İkinci hasat yılında üç zeytin tipinin de toplam fenol içerikleri ilk hasat yılına göre daha düşük olmuştur. Hasat yılına bağlı olarak toplam fenol içeriğindeki değişim zeytinyağı için literatürde çeşitli defalar bildirilmiştir (Ocakoglu vd., 2009; Alkan vd., 2012). Bu çalışmada incelenen zeytinler için miktarlar yıllara göre farklılık göstermekle beraber Erkence en yüksek ve Hurma en düşük fenol içeriğine sahip olan zeytinler olarak seyir iki yılda da aynı şekildedir.

ANOVA, zeytin tipinin, hasat zamanının ve hasat yılının toplam fenol içeriği üzerinde etkisini belirlemek amacı ile kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir. Bu analize göre bütün faktörler ve onların etkileşimleri önemlidir ve modelin R^2 değeri %91,7'dir. Buna göre toplam fenol içeriği zeytin tipinden, hasat zamanından ve hasat yılından etkilenmektedir.

Tablo 9. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin toplam fenol içeriği verileri için ANOVA tablosu

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Zeytin tipi	2	1412364	1412364	706182	102,43	0,00
Hasat yılı	1	2802655	2802655	2802655	406,50	0,00
Hasat zamanı	7	684942	684942	97849	14,19	0,00
Z. tipi*H. yılı	2	116157	116157	58079	8,42	0,00
Z. tipi*H. zamanı	14	690419	690419	49316	7,15	0,00
H. yılı*H. zamanı	7	918877	918877	131268	19,04	0,00
Z. tipi*H. yılı*H. zamanı	14	685990	685990	48999	7,11	0,00
Hata	96	661878	661878	6895		
Toplam	143	7973283				

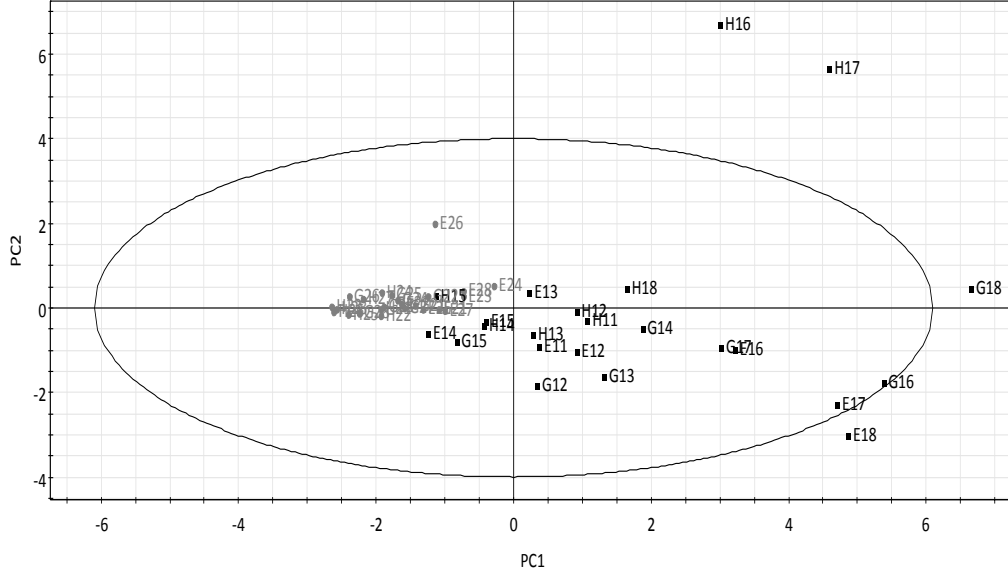
4.1.4. Zeytinlerin Fenol Profilleri

Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılına ait ve sekiz haftalık olgunlaşma süresince fenol profilleri Tablo 7 ve 8'de sunulmuştur. Tablolardan da görüleceği üzere kuersetin-3-glukozit, bütün zeytin tipleri için ilk hasat yılında tespit edilen ancak ikinci yılda rastlanmayan tek fenoldür. Buna ek olarak, luteolin ilk yıl Hurma ve Gemlik örneklerinde bulunurken ikinci yıl Hurma'da tespit edilememiş ve Gemlik'de sadece ilk üç haftada rastlanmıştır.

Zeytin tipleri, hasat zamanı ve hasat yılları arasındaki farklılıkları görmek amacı ile çok değişkenli bir analiz tekniği olan PCA uygulanmış ve bu analize hem toplam fenol içeriği hem de fenol profil verileri dahil edilmiştir. Oluşturulan modellerin R^2 değerleri çok yüksek olmamasına rağmen PCA grafikleri yine de parametrelerin etkilerini göstermek açısından

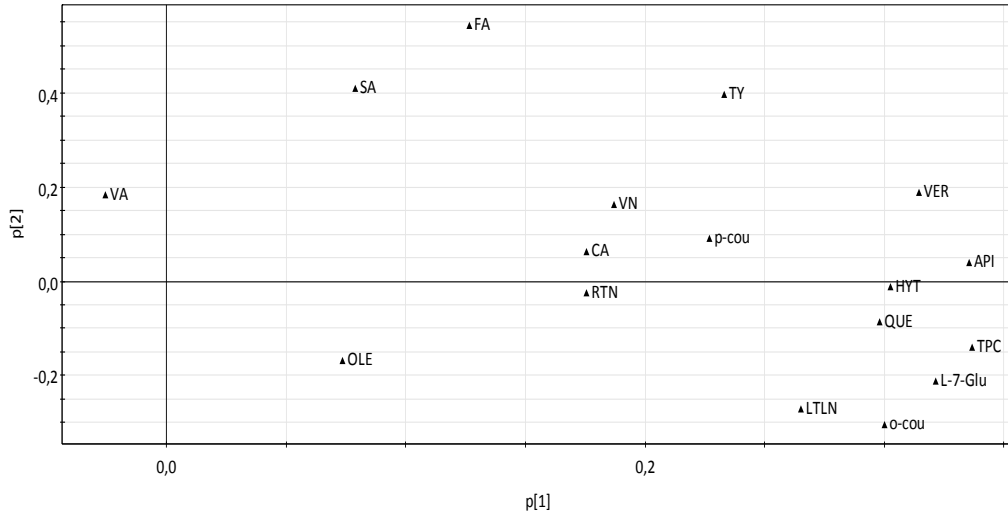
yararlıdır. Bu tür bir veri analizi olmadan bu kadar çok sayıda veriyi aynı zamanda değerlendirerek bir sonuca ulaşmak daha zor bir yaklaşımdır.

a)



SIMCA-P 10.5 - 30.04.2013 14:15:00

b)



SIMCA-P 10.5 - 30.04.2013 14:17:32

Şekil 12. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait fenol profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri

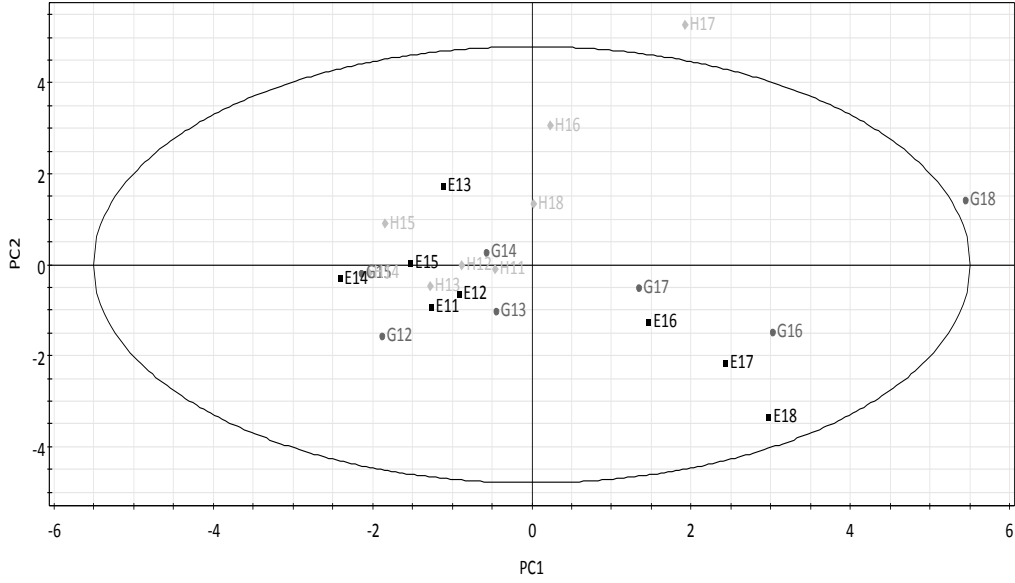
İki senenin de verileri kullanılan PCA ile 2 asal bileşene sahip R^2 değeri 0,48 olan bir model elde edilmiştir. Bu model için skor grafiği Şekil 12a'da verilmiştir. Bu grafiğe göre iki

hasat yılı arasında fenol profili açısından bir farklılık görülmüştür (İlk hasat yılının beşinci haftasına ait Hurma örneği dışında). 2011/12 sezonunun ilk beş hafta örnekleri 2012/13 örneklerine daha yakın durmaktadırlar. İlk yılın daha sonraki haftaları (6-8) diğerlerinden tamamen ayrık bir vaziyette ve grafiğin sağ kısmında yer almaktadır. Genel olarak, vanilik asit dışındaki tüm fenoller, 2011/12 sezonunda daha yüksek konsantrasyonlardadır. Bu nedenle de bu fenoller skor grafiğinde sağ cephede bulunan ilk yıl örnekleri ile aynı tarafta yani yükleme grafiğinin (Şekil 12b) sağ tarafında yer alırlar ve bunlar ilk yıl örneklerini ayrılmasına neden olan fenollerdir.

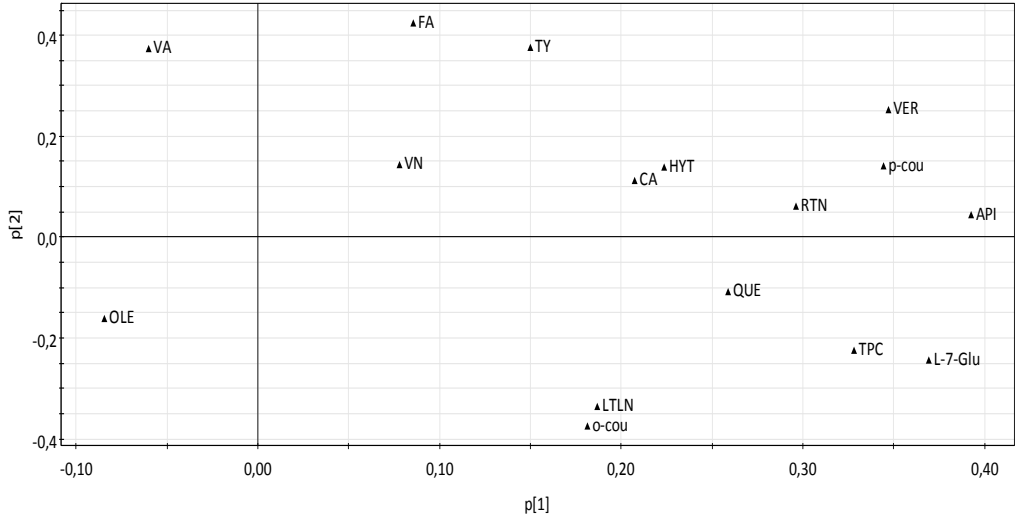
Zeytin tipleri arasındaki farklılıkları daha iyi anlamak amacı ile hasat yılı verileri ayrı ayrı PCA ile değerlendirilmiştir. İlk yıl için skor ve yükleme grafikleri Şekil 13'de sunulmuştur. İlk yıl modeli 2 bileşenlidir ve R^2 değeri 0,46'dır. Skor grafiği (Şekil 13a), ilk beş haftada zeytin tipleri arasında pek bir farklılık olmadığını göstermektedir. Ancak ilk beş hafta ile son üç hafta ise birbirinden tamamen ayrılmaktadır. Aslında bu son üç hafta zeytin hasatının çoğunun yapıldığı zamandır. Yükleme grafiğine (Şekil 13b) göre oleuropein ve vanilik asit erken hasat dönemini daha sonraki dönemden ayıran fenoller olarak görülmektedir. Erken hasat örneklerinin oleuropein ve vanilik asit içerikleri daha geç döneme göre daha yüksektir. Son üç haftanın örneklerinin de zeytin tiplerine göre ayrıldıkları görülebilir. Erkence skor grafiğinin sağ alt dördünde ve Hurma'da sağ üst dördünde yer almaktadır.

Gemlik zeytini, diğer tiplere göre ilk yılın son üç haftasında yüksek hidroksityrosol (3.704,2-8.183,3 mg/kg) ve apigenin (22.139,3-31.838,7 mg/kg) içeriğine sahiptir. Genel olarak örnekleme periyodunda Erkence'nin oleuropein içeriği (1.379-1.388,2 mg/kg) Hurma'ya (0-1.166,9 mg/kg) göre daha yüksektir. Yükleme grafiğine (Şekil 13b) göre luteolin, o-kumarik asit, luteolin-7-glukozit ve toplam fenol içeriği Erkence'yi ayıran parametrelerdir. Erkence en yüksek toplam fenol içeriğine sahip olan zeytindir ve luteolin konsantrasyonu da (168,4-351,2 mg/kg) son üç hafta bu zeytinde yüksektir. Hurma zeytininin vanilin, ferulik asit ve tyrosol içeriği son üç haftada bu zeytini diğerlerinden ayıran parametrelerdir.

a)



b)

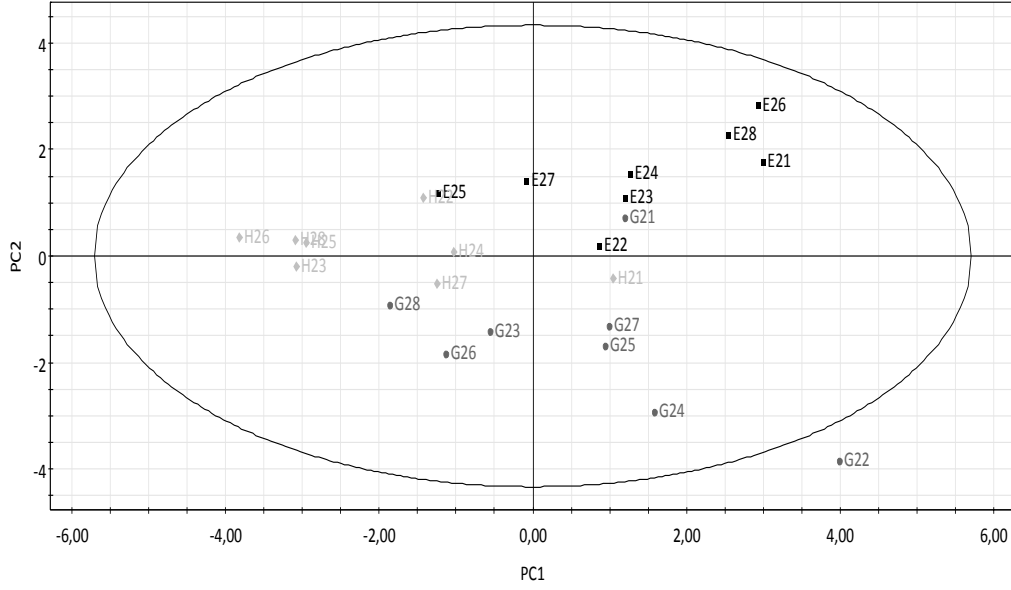


Şekil 13. Erkece, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait fenol profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri

Literatürde bildirildiği üzere, haftalar arası inişler çıkışlar olmasına rağmen oleuropein genel olarak azalan bir grafik sergilemiştir. Bu inişli çıkışlı durum başka araştırmacılar tarafından da gözlenmiştir (Dağdelen vd., 2012). Bu tip bir gıda literatürde bulunan bir çalışmada çıkarılan sonuçla açıklanabilir; fenoller, olgunlaşma sırasında ihtiyaca göre

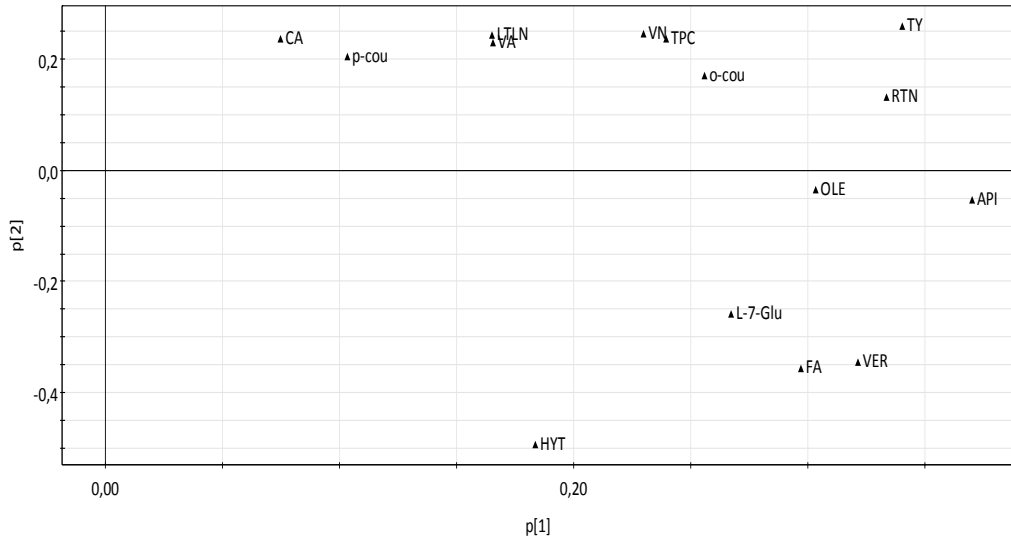
devamlı olarak salgınlamaktadırlar (Menz ve Vriesekoop, 2010). Fenoller, bitkiler tarafından üretilen ikincil metabolitler ve bitkilerin savunma mekanizmalarının bir parçası oldukları için çevre veya diğer koşullara bağlı olarak ihtiyaç halinde salgılanırlar. Bu nedenle de miktarları zaman zaman artış zaman zaman ise düşüş gösterebilir.

a)



SIMCA-P 10.5 - 30.04.2013 14:46:47

b)



SIMCA-P 10.5 - 30.04.2013 14:48:22

Şekil 14. Erkençe, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2012/13 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait fenol profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri

İlk hasat yılı Hurma örneklerinde oleuropeinin düşüş seyrinde çok belirgin olmamakla beraber yine de bir azalmadan söz edilebilir. Dalında tatlılaşan Dhokar ve normal bir zeytin tipi olan Chemlali ile ilgili bir çalışmada bu iki tip zeytin için oleuropein miktarında belirgin bir düşüş ve hidrosityrosol konsantrasyonunda da olgunlaşmayla beraber bir artış görülmüştür (Jemai vd., 2009). Oleuropein miktarı Dhokar için belirlenemeyecek seviyelere inerken Chemlali'de belirli bir düzeyde kalmıştır. Benzer bir seyir oleuropein için bu çalışma da gözlemlenmişken hidrosityrosolda ki artış Hurma veya diğer zeytinlerde görülmemiştir. Genel olarak dalında tatlılaşma olayı ile ilgili çalışmalar oleuropeinin zeytine acılık veren bir fenol olması nedeniyle bu fenol üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak bu çalışmada görüleceği üzere sadece oleuropein değil hemen hemen diğer bütün fenollerde bu doğal tatlılaşma olayından etkilenmektedirler. Bu gözlem Hurma'nın daha düşük olan toplam fenol içeriği ile de doğrulanmaktadır. Diğer araştırmacılar tarafından belirtildiği üzere fenol bileşiklerindeki bu değişimlerin nedeni β -glukosidaz ve esteraz enzimlerin aktiviteleri ile ilişkilendirilebilir (Jemai vd., 2009).

4.1.5. Zeytinlerin Yağ İçerikleri

Üç zeytin tipi için hasat yılına ve zamanına bağlı olarak yağ içerikleri Tablo 10'da verilmiştir. Yağ miktarı zeytin tipine, hasat zamanına ve yılına göre farklılıklar göstermiştir. İlk hasat yılında daha yüksek yağ oranları %14,57-61,71 aralığında olmak üzere Hurma zeytininde gözlemlenmiştir. İlk hasat yılında Erkence'nin yağ oranı %17,07-65,92 olarak değişmekte iken Gemlik için bu oran %12,11-66,82 olmuştur.

Genel olarak ikinci yılda yağ oranları ilk yıla göre oldukça düşük olmuştur. İkinci yıl Gemlik için %29,24-58,75 oranlarında ve diğer çeşitlere göre daha yüksek oranda yağ oranı bulunmaktadır. 2012/13 hasat yılında Erkence ve Hurma'nın yağ oranları sırası ile %15,25-31,04 ve %19,63-46,65 aralığında değişmektedir.

Tablo 10. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde yağ içerikleri

Hurma	Yağ İçeriği		Yağ İçeriği		Yağ İçeriği	
	(%)	Erkence	(%)	Gemlik	(%)	
<i>2011/12</i>						
H11	34,91	E11	28,77	G11	12,11	
H12	14,57	E12	17,07	G12	48,59	
H13	41,37	E13	13,68	G13	39,17	
H14	43,99	E14	44,21	G14	59,49	
H15	49,91	E15	37,98	G15	40,59	
H16	61,52	E16	51,16	G16	66,82	
H17	61,71	E17	62,61	G17	64,94	
H18	47,46	E18	65,92	G18	63,94	
<i>2012/13</i>						
H21	31,04	E21	30,1	G21	39,22	
H22	28,46	E22	26,53	G22	58,75	
H23	27,43	E23	46,65	G23	51,91	
H24	37,52	E24	21,16	G24	58,53	
H25	21,64	E25	19,64	G25	40,17	
H26	16,21	E26	25,79	G26	29,24	
H27	15,25	E27	39,56	G27	50,98	
H28	19,17	E28	28,03	G28	44,83	

4.1.6. Zeytinlerin Yağ Asidi Profilleri

Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinleri için hasat zamanına ve yılına bağlı olarak yağ asidi profilleri Tablo 11 ve 12'de sunulmuştur. İki hasat yılı için bütün zeytin tiplerinde, beklendiği şekilde oleik asit (18:1n9) başlıca yağ asididir. Önceki çalışmalarda olgunlaşma sürecinde oleik asit içeriğinin arttığı görülmüştür (Issaoui vd., 2008). Ancak, bu çalışmada lineer bir artış eğilimi üç tip zeytin içinde gözlemlenmemiştir. Ayrıca ikinci sezona ait örneklerde oleik asit içeriği ilk sezona göre daha düşüktür.

Tablo 11'de görülebileceği gibi 2011/12 hasat yılında oleik asit oranı Hurma zeytininde en yüksek değere (%66,85) üçüncü haftada ulaşırken 2012/13 hasat yılında en yüksek değer %64,95 olarak altıncı haftada tespit edilmiştir. İlk yıl oleik asit oranlarının en çok olduğu zeytin Erkence'dir ve bu oran %68,75-71,83 aralığında değişmektedir. Bununla beraber ikinci yıl oran %60,5-66,82 aralığına düşmektedir. Gemlik'te iki yılda da benzer

oranlarda oleik asit tespit edilmiştir ve bu oranlar ilk ve ikinci yıl için sırası ile %61,86-65,87 ve %63,05-66,79 aralığında olmuştur.

Palmitik asit (16:0) yüksek oranlarda bulunan diğer bir yağ asididir. İlk hasat yılında palmitik asit Gemlik örneklerinde %8,55-18,94 aralığında tespit edilmiştir. Erkence çeşidinde ise bu yağ asidinin oranı örnekleme sürecinde %13,81'den %11'e düşmüştür. Bu tür bir düşüş eğilimine başka çalışmalarda da rastlanmıştır (Beltran vd., 2004; Ayton vd., 2007; Manai vd., 2007). Hurma da palmitik asit oranları ilk yıl %14,17-15,94 aralığında iken aynı oran ikinci yıl %12,55-14,28 olarak değişmiştir.

İki hasat yılı için de linoleik asitin (18:2n6) en yüksek konsantrasyonlarda olduğu zeytin Hurma'dır. Hurma'nın ilk yıl en yüksek linoleik asit oranı %17,19 iken ikinci yıl bu oran %22,47 olmuştur. Tatlı Dhokar türünde de linoleik asit içeriği (%22,29) diğer zeytin çeşitlerine göre daha yüksektir (Rigane vd., 2013). Gemlik zeytininde ilk sezon linoleik asit, örnekleme son üç haftasında artış göstererek son hafta en yüksek değerine (%15,97) ulaşmıştır. Ancak ikinci sezon bu yağ asidi, örnekleme süresince artış göstermiştir (%11,78-16,11). Erkence'de ise ilk yılın ilk dört haftası linoleik asit içeriği hemen hemen aynı kalmış ve daha sonra düşüş göstermiştir. İkinci yılda ise ilk haftalarda daha yüksek oranlarda (%18,25) linoleik asit tespit edilmiş daha sonra bu oran azalarak en düşük seviyeye (%13,56) altıncı haftada ulaşmıştır.

Stearik asit (18:0), bütün zeytinlerde %1,66-4,39 gibi daha düşük oranlarda bulunmaktadır. Tablo 11 ve 12'den görülebileceği gibi palmitoleik (16:1n7), linolenik (18:3n3), linoleadik (18:2n6t), behenik (22:0), arakidik (20:4n6), lignoceric (24:0), heptadecanoic (17:0), nervoik (24:1), cis-11-eicosanoic (20:1) asitler daha düşük oranlarda iki hasat yılında da bulunmuştur. Cis-10-heptadecanoic asit (17:1) ise sadece ikinci yıl tespit edilmiştir.

Tablo 11. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde yağ asidi profilleri (%)

Zeytin tipi	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3	C18:2n6t	C20:0	C20:1	C20:4n6	C20:5n3	C22:0	C24:0	C24:1
H11	14,64	0,77	0,12	2,72	62,80	17,01	0,30	0,038	0,41	0,85	0,037	0,11	te	0,07	te
H12	15,32	0,96	0,11	2,67	60,38	18,04	0,28	te	0,42	0,86	0,034	0,37	0,11	0,06	0,04
H13	14,17	0,75	0,14	2,96	66,85	19,97	0,33	te	0,47	0,87	0,042	0,43	0,25	0,06	te
H14	13,59	0,66	0,12	3,01	64,19	16,25	0,31	0,014	0,47	0,80	0,036	0,25	0,13	0,06	te
H15	15,9	1,19	0,13	3,01	62,80	14,78	0,27	te	0,46	0,67	0,034	0,27	0,12	0,05	te
H16	14,68	0,55	te	2,62	66,53	15,038	te	te	te	0,55	te	te	te	te	te
H17	14,9	0,64	te	2,85	63,63	16,97	te	te	0,37	0,69	te	te	te	te	te
H18	15,43	0,66	te	3,09	62,85	17,19	te	te	te	0,66	te	te	te	te	te
E11	13,81	0,58	0,14	2,65	66,50	14,29	0,30	0,042	0,43	0,74	0,046	0,08	0,15	0,05	0,02
E12	13,53	0,58	0,13	2,74	66,38	14,17	0,32	te	0,45	0,65	0,069	0,19	0,11	0,08	0,20
E13	13,89	0,55	0,16	3,07	65,78	14,37	0,29	te	0,37	0,62	te	te	0,10	0,07	0,45
E14	12,13	0,47	0,14	2,62	68,59	14,15	0,30	0,051	0,41	0,69	0,023	0,11	0,11	0,14	0,037
E15	12,34	0,50	0,15	2,63	69,01	13,43	0,32	0,04	0,41	0,67	0,024	0,064	0,11	0,06	0,044
E16	11,60	0,27	te	2,66	71,82	12,80	te	te	0,30	0,58	te	te	te	te	te
E17	11	0,34	te	2,86	72	13	te	te	0,30	0,51	te	te	te	te	te
E18	11,81	0,38	0,12	2,33	70,59	13,58	0,20	te	0,30	0,58	te	te	0,09	te	te
G12	16,79	1,17	0,12	3,33	61,86	12,87	0,20	te	0,48	0,59	te	te	te	te	te
G13	16,79	1,40	0,12	2,91	63,90	13,43	0,26	te	0,41	0,59	te	te	0,11	te	te
G14	15,70	1,28	0,12	2,82	65,86	12,78	0,26	te	0,43	0,59	te	te	0,11	0,09	te
G15	8,55	1,17	0,11	3,16	65,33	12,79	0,25	te	0,46	0,54	te	0,14	0,11	te	te
G16	15,56	0,99	0,10	3,60	64,80	13,62	0,18	te	0,41	0,51	te	te	0,08	0,03	te
G17	15,88	1,24	0,09	2,27	64,59	14,57	0,23	te	0,32	0,549	te	te	0,08	0,03	te
G18	15,48	0,95	0,01	2,67	63,89	15,97	0,2	te	0,56	0,55	te	te	0,07	0,03	te

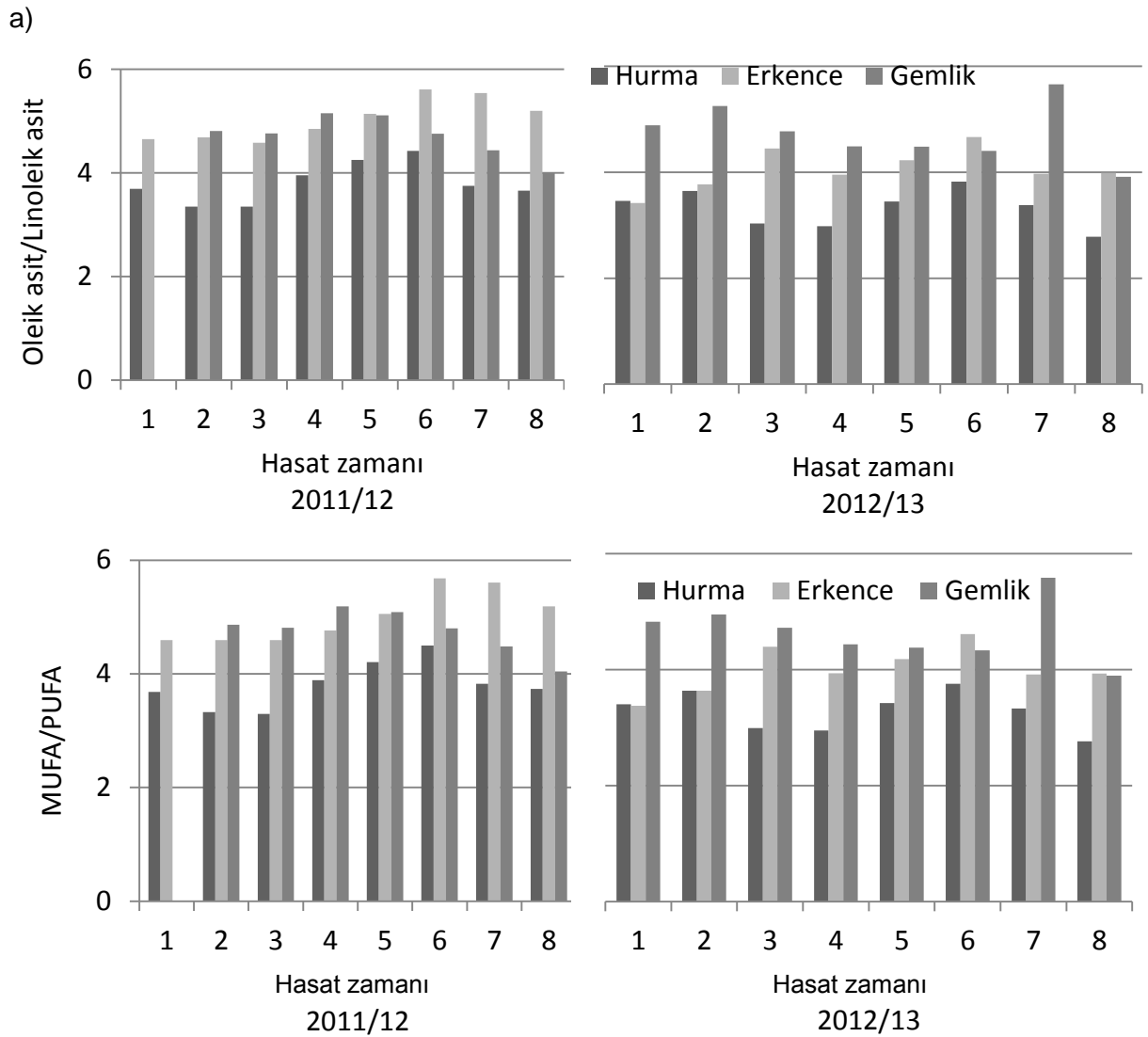
te: tespit edilemedi

Tablo 12. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının sekiz haftalık örnekleme sürecinde yağ asidi profilleri (%)

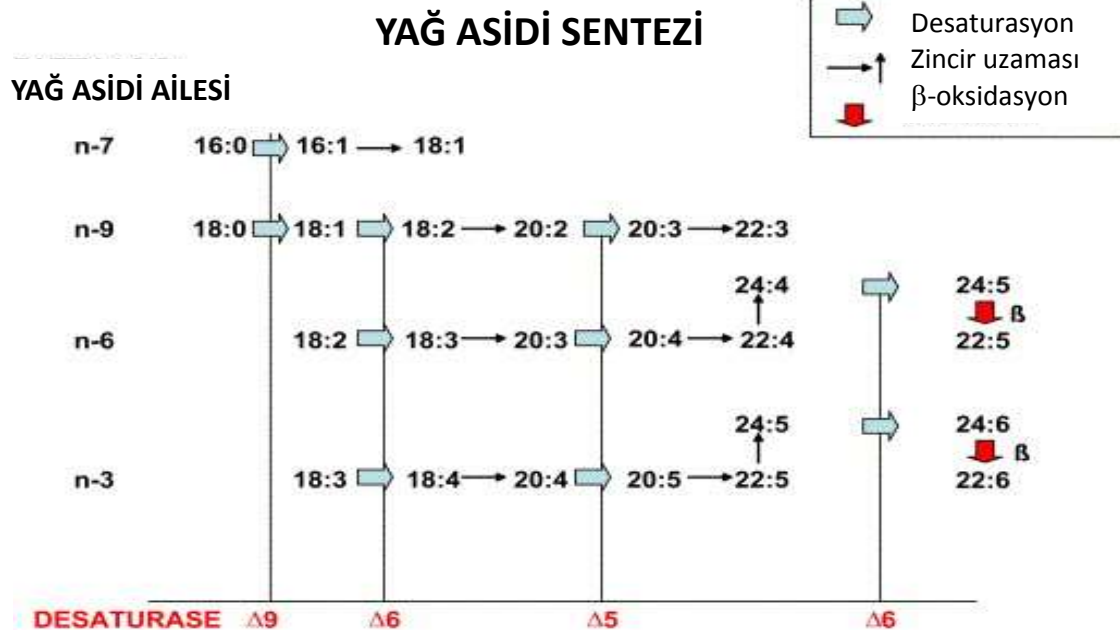
Zeytin tipi	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3	C20:0	C20:4n6	C20:1	C21:0	C22:0	C24:0
H21	14,28	0,53	0,20	0,16	4,39	61,012	17,64	0,24	0,36	0,39	0,65	te	0,14	0,058
H22	13,84	0,55	0,21	0,22	3,7	62,82	17,24	0,23	0,31	0,16	0,56	te	0,14	te
H23	13,65	0,53	0,17	0,35	2,76	60,66	19,99	0,21	0,41	0,23	0,64	te	0,38	0,063
H24	13,76	0,46	0,27	0,42	2,75	60,30	20,24	0,31	0,31	0,38	0,61	0,013	0,13	0,046
H25	12,7	0,44	0,18	0,27	2,30	63,32	18,36	0,24	0,35	0,29	0,69	0,14	te	te
H26	12,28	0,46	0,19	0,54	3,15	64,95	16,99	0,22	0,33	0,50	0,61	0,06	te	te
H27	12,55	0,45	0,30	0,37	2,93	62,99	18,65	0,42	0,32	0,30	0,71	0,25	te	te
H28	13,08	0,51	0,15	0,17	2,70	62,45	22,48	0,28	0,28	0,33	0,72	te	te	te
E21	13,68	0,49	0,21	0,20	2,46	62,50	18,28	0,21	0,32	0,38	0,57	te	te	te
E22	15,18	0,58	0,3	0,34	5,22	60,49	16,03	0,47	0,31	0,54	0,53	te	te	te
E23	12,59	0,57	0,31	0,38	2,69	66,81	15,02	0,23	0,33	0,29	0,6	te	0,28	te
E24	13,029	0,45	0,59	0,43	2,86	65,10	16,48	0,19	0,33	0,23	0,58	te	te	te
E25	12,96	0,46	0,21	0,23	2,57	66,36	15,7	0,21	0,34	0,245	0,54	te	0,32	te
E26	15,29	1,24	te	te	2,42	63,24	13,56	0,16	0,34	0,36	0,47	te	te	te
E27	12,60	0,59	te	0,19	2,48	64,49	16,24	0,26	0,32	0,29	0,51	te	te	te
E28	12,57	0,489	0,19	0,36	2,48	64,17	16,10	0,21	0,32	0,33	0,51	te	0,36	te
G21	16,46	1,42	0,23	0,17	3,03	63,48	12,99	0,20	0,34	0,38	0,51	te	0,79	te
G22	16,66	1,46	0,10	0,08	2,65	64,37	12,26	0,48	0,33	0,65	0,46	te	0,47	te
G23	15,57	1,15	0,14	0,31	2,55	64,92	13,60	0,26	0,39	0,32	0,61	te	0,15	te
G24	16,24	1,35	0,12	0,22	1,67	64,30	14,34	0,28	0,32	0,36	0,62	te	0,15	te
G25	15,69	1,25	0,26	0,17	2,48	64,01	14,28	0,30	0,35	0,47	0,56	te	0,14	te
G26	12,75	0,48	0,14	0,24	2,83	66,79	15,17	0,24	0,37	0,28	0,58	te	0,10	te
G27	14,63	1,18	0,20	0,29	2,34	66,63	11,78	0,22	0,35	0,28	0,51	te	0,13	te
G28	15,42	1,10	0,12	0,21	2,39	63,05	16,10	0,21	0,35	0,32	0,54	te	0,17	te

te: tespit edilemedi

Hurma zeytinlerin oleik asit/linoleik asit oranlarının Erkence ve Gemlik türlerine göre daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 15a). Buna ek olarak iki yılda da Hurma'nın linoleik asit içeriği diğerlerine göre daha yüksektir. Aynı şekilde bir eğilim tatlı Dhokar zeytini içinde gözlenmiştir (Rigane vd., 2013). Bu durum bitkilerde oleik asidin linoleik aside dönüşmesini katalize eden desaturase enzim aktivitesinin arttığına bir göstergesi olabilir. Ayrıca, Hurma için diğer zeytinlere göre daha düşük olan MUFA/PUFA oranı da bu hipotezi güçlendirmektedir (Şekil 15b). Yağ asidi desaturase enzimleri yağ asitlerinde çift bağ oluşumunu katalize eden enzimlerdir ve desaturase enzimin yağ asidi sentezindeki rolü Şekil 16'da gösterilmiştir. Zeytinlerde dalında acılığını yitirme ile ilgili bu şekilde bir bulguya ilk defa bu çalışma ile ulaşılmaktadır.



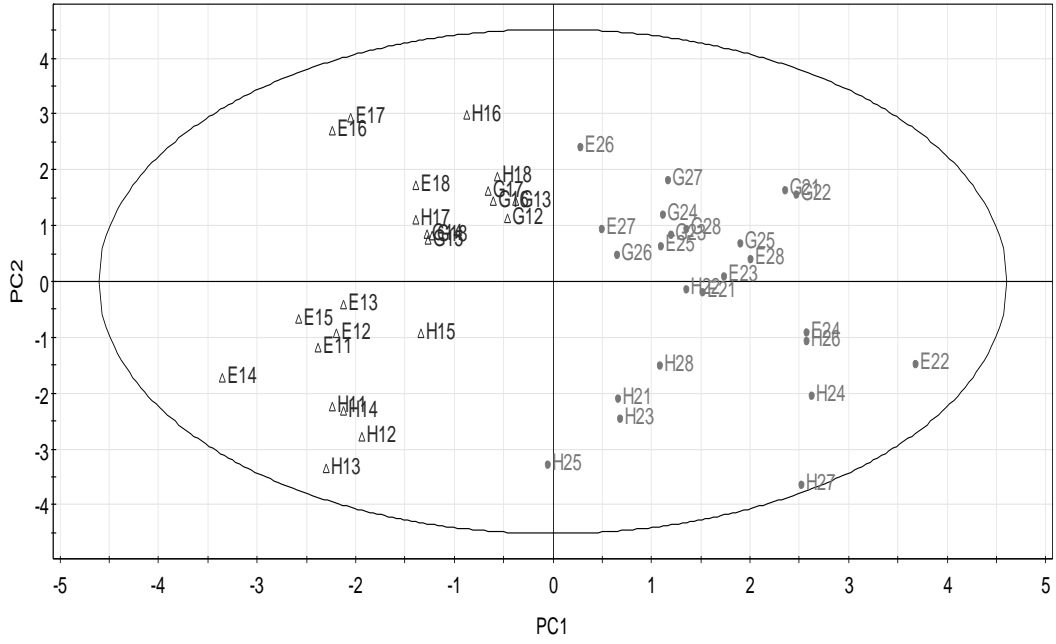
Şekil 15. Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılında sekiz haftalık örnekleme sürecinde a) oleik asit/linoleik asit ve b) MUFA/PUFA oranları



Şekil 16. Bitkilerde yağ asidi sentezi ve desaturase enziminin sentezdeki fonksiyonu (www.sciencedirect.com)

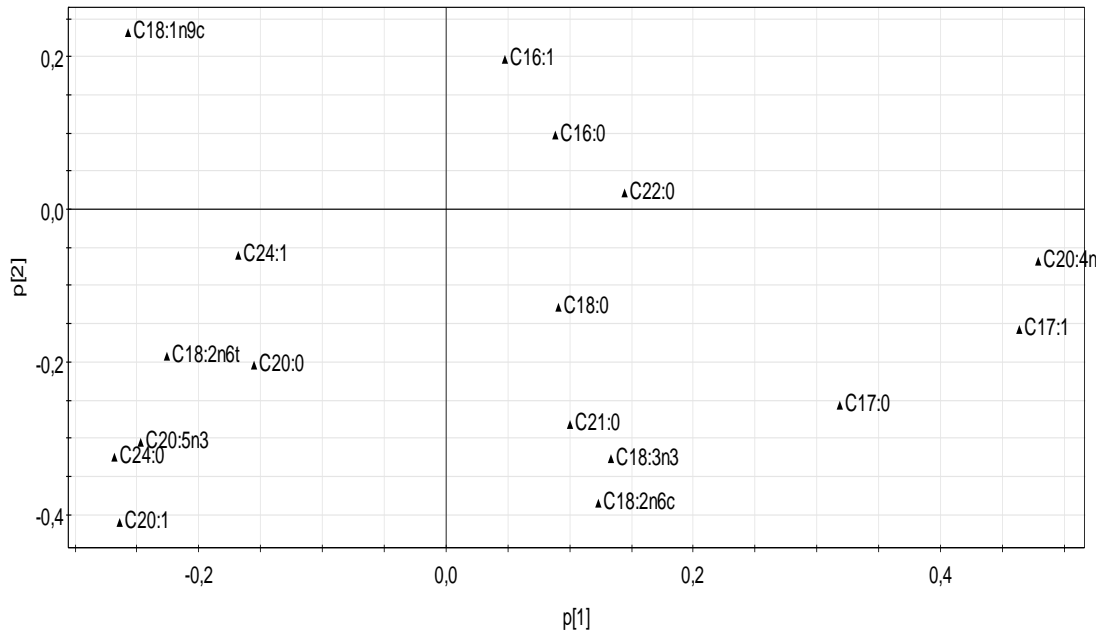
Zeytin tipleri, hasat zamanı ve yılı arasındaki farklılıkları görmek amacıyla veri analizinde PCA kullanılmıştır. İki seneyi kapsayan yağ asidi verileri ile oluşturulan PCA modeli 4 asal bileşenden oluşmaktadır ve R^2 değeri ise 0,61'dir. Bu model için skor ve yükleme grafikleri Şekil 17'de sunulmuştur. Skor grafiğine (Şekil 17a) göre ilk ve ikinci hasat yılları arasında yağ asidi kompozisyonu bakımından açık bir ayrım görülmektedir. Hurma zeytinin ilk yıl örneklerinden ilk beş haftaya ait olanları grafiğin sol alt dördünde yer almaktadır. İlk yılın son üç haftasının örnekleri (6-8 hafta) diğerlerinden tamamen ayrık vaziyette sağ üst dördünde bulunmaktadır. İlk yıl örneklerinin oleik asit içerikleri daha yüksek olduğundan bu asit, ilk yıl için ayırıcı bir parametre olarak yükleme grafiğinin solunda yer almaktadır (Şekil 17b). 2012/13 sezonu Gemlik zeytinleri daha yüksek palmitik asit konsantrasyonuna sahiptir. Bu nedenle palmitik asit yükleme grafiğinin sağında ve Gemlik örnekleri de yine skor grafiğinin sağında bulunmaktadır.

a)



SIMCA-P 10.5 - 28.06.2013 09:17:33

b)



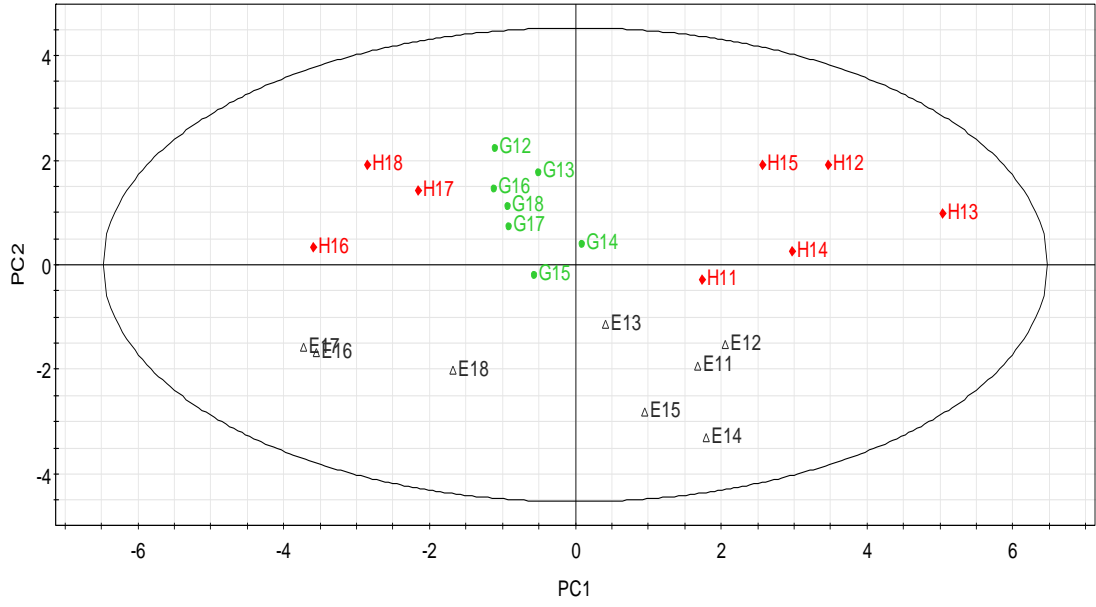
SIMCA-P 10.5 - 19.06.2013 08:44:51

Şekil 17. Erkence, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait yağ asidi profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri

Zeytin tipleri arasındaki farklılıkları daha iyi anlamak için farklı yıllara ait yağ asidi verileri PCA ile ayrı ayrı da analiz edilmiştir. İlk yıl verileri ile oluşturulan PCA modeli 3 asal bileşene sahiptir ve R^2 bu model için 0,68'dir. Elde edilen skor ve yükleme grafikleri Şekil 18'de gösterilmiştir. Gemlik örnekleri çoğunlukla elipsoidin merkezi çevresinde bulunmaktadır. Yağ asitleri profilleri açısından Hurma ve Erkence ile Gemlik ve Erkence arasında çok açık bir ayrışma olduğu skor grafiğinden görülmektedir (Şekil 18a). Yükleme grafiğine (Şekil 18b) göre palmitik, palmitoleik ve stearik asitler, Gemlik örneklerinin grafiğin merkezine yerleşmesine neden olan yağ asitleridir. Gemlik ilk yılın bütün örnekleme sürecinde sözü edilen yağ asitlerinin en yüksek olduğu zeytindir. Erkence'nin Hurma ve Gemlik'ten ayrılmasına neden olan başlıca yağ asidi ise oleik asittir. Erkence'nin oleik asit içeriği (%66,38-72,19) olgunlaşma sırasında diğerlerine göre daha yüksek olup zamanla artarak yedinci haftada en yüksek değerine ulaşmıştır. Erkence'nin linolenik ve gondoik (20:1n9) asit içerikleri de Gemlik örneklerine göre daha çoktur. Bundan dolayı bu yağ asitleri yükleme grafiğinde Hurma ve Erkence arasında bulunmaktadır. İlk beş haftanın Hurma örnekleri son üç haftadan ayırık durumdadır çünkü bu duruma neden olan eicosopentaenoik (20:5n3) ve heneicosanoik (21:0) asitler örnekleminin daha erken bölümünde bulunurken daha sonra kaybolmaktadırlar. Hurma'nın diğerlerinden ayrışmasına neden olan başlıca yağ asidi ise bu zeytinde daha yüksek miktarlarda (%14,79-18,45) görülen linoleik asittir.

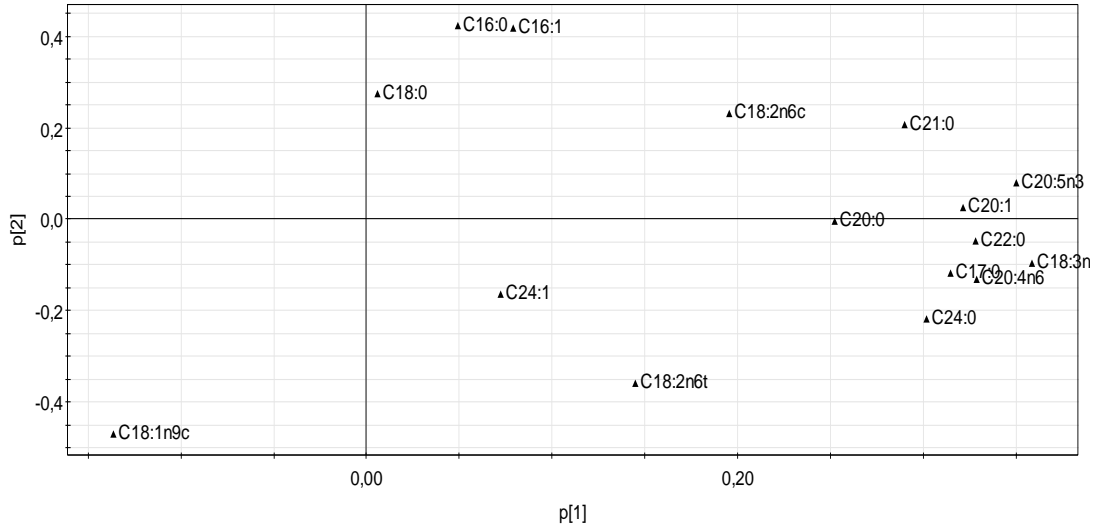
İkinci yılın yağ asidi verileri ile elde edilen PCA modeli 2 bileşenle oluşturulmuş olup R^2 değeri 0,48'dir. İkinci yıl için PCA, zeytin tipleri arasında daha iyi bir ayırım sağlamıştır (Şekil 19a). İlk haftanın örnekleri dışında diğerleri yağ asidi profillerine göre zeytin tipine bakarak birbirlerinden ayrılmışlardır. Erkence ve Gemlik örneklerinin bazıları kendi gruplarından biraz uzakta bulunmalarına rağmen bu tipler arasında bir ayırım olduğu açıktır. Yükleme grafiğine göre (Şekil 19b) palmitik ve palmitoleik asitler, ilk yılda olduğu gibi ikinci yılda da Gemlik için ayırt edici yağ asitleri olmuşlardır. Hurma, diğer zeytinlerden daha yüksek stearik ve linoleik asit içeriğine sahip olması nedeni ile farklılaşmaktadır. Hurma ilk yılda da daha yüksek linoleik asit içeriğine sahip olan zeytindir. Erkence ve Gemlik örneklerinin ikinci yıl oleik asit içerikleri benzer olması nedeni ile bu yağ asidi, yükleme grafiğinde Erkence ve Gemlik arasında yer almaktadır.

a)



SIMCA-P 10.5 - 28.06.2013 09:24:12

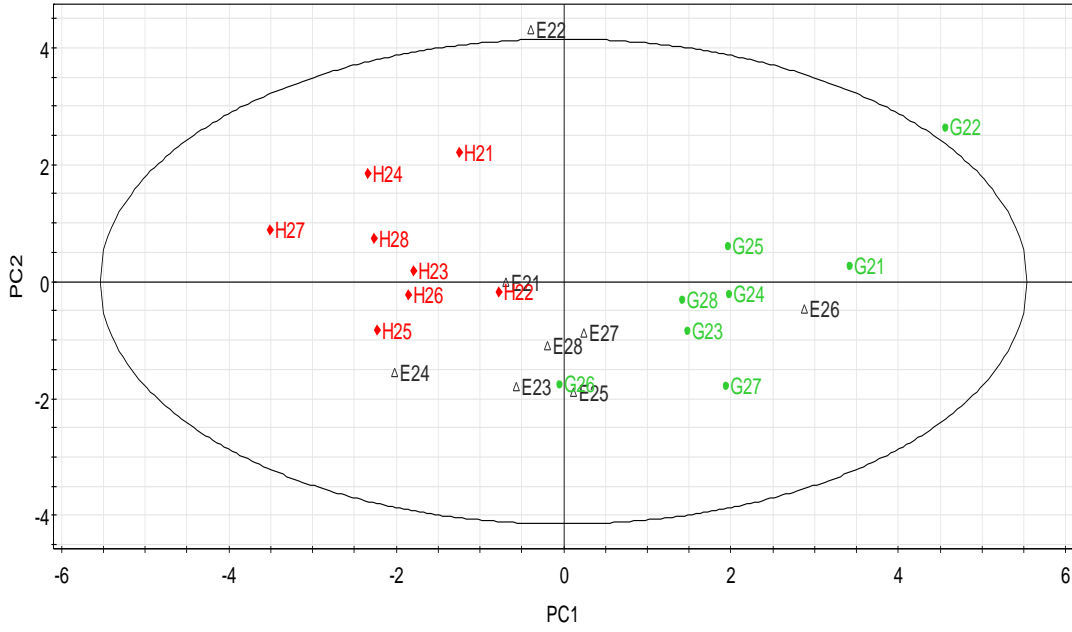
b)



SIMCA-P 10.5 - 19.06.2013 09:08:50

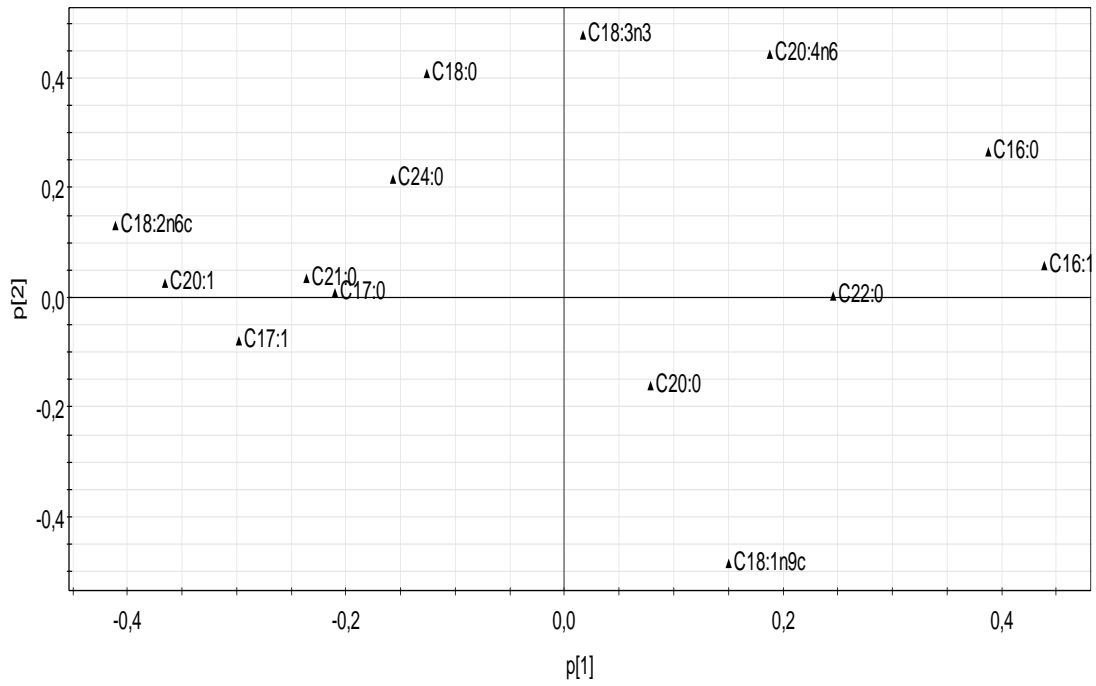
Şekil 18. Erkece, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2011/12 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait fenol profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri

a)



SIMCA-P 10.5 - 28.06.2013 09:28:27

b)



SIMCA-P 10.5 - 19.06.2013 09:19:24

Şekil 19. Erkençe, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin 2012/13 hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait fenol profil verileri ile oluşturulan PCA modelinin a) skor ve b) yükleme grafikleri

Sonuç olarak yağ asidi profili zeytin türlerine ve hasat yılına bağlı olarak bir ayrım sağlamaktadır. Hurma diğerlerinden özellikle linoleik asit içeriği ile ayrılmaktadır ve buna neden olarak da dalında tatlılaşma sürecinde desaturase enziminin aktivitesinin artış gösterdiği düşünülmektedir.

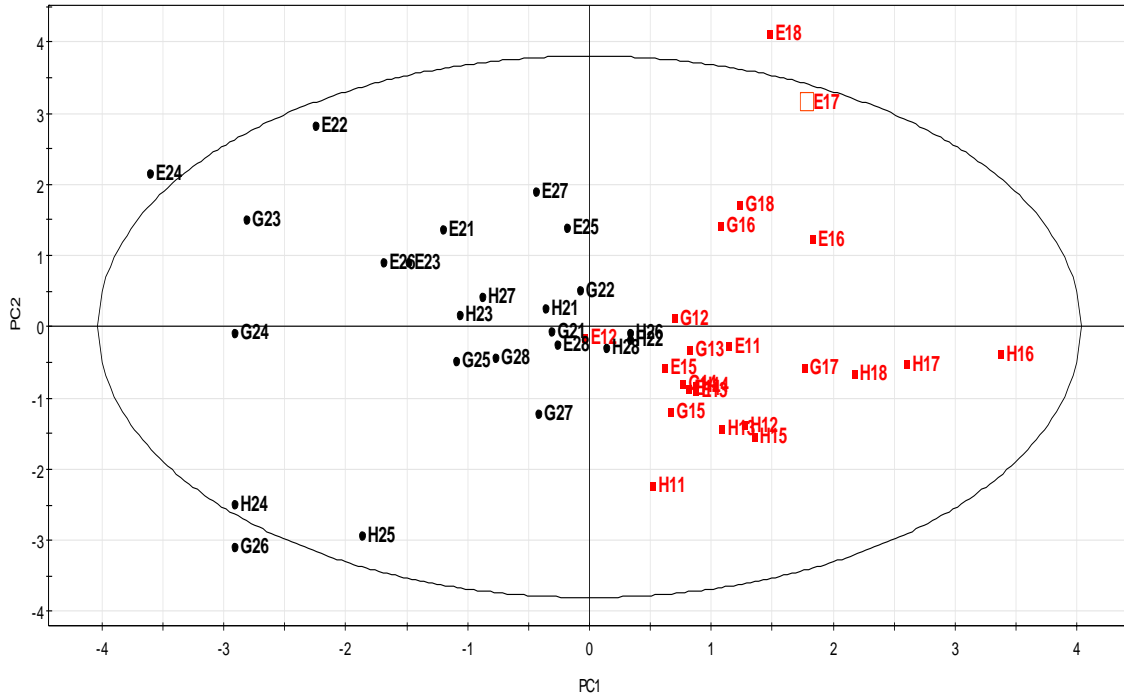
4.1.7. Değişik Parametrelerin Kombinasyonu

Zeytin türleri arasındaki farklılıkları daha iyi anlayabilmek için değişik parametreler birleştirilerek PCA ile değerlendirilmiştir. Bu kombinasyonlar:

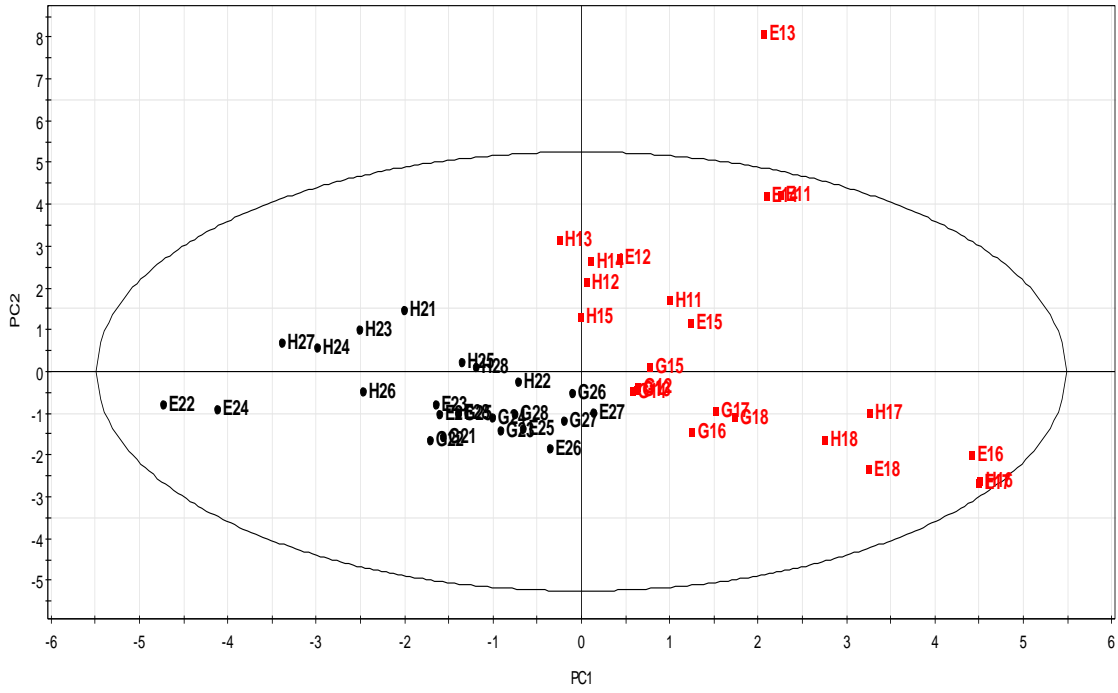
- şeker profili+organik asit profili (Şekil 20a),
- şeker profili+yağ asidi profili (Şekil 20b),
- şeker profili+organik asit profili+yağ asidi profili+fenol profili+ toplam fenol içeriği (Şekil 20c).

Bu analizlerin PCA skor grafikleri Şekil 20'de sunulmuştur. PCA modelleri ile bilgiler de yine bu grafiklerde verilmiştir. Skor grafiklerinden görülebileceği gibi bu kombinasyonlar sadece hasat yılına göre bir ayrım sağlamakta zeytin tipine göre ise bir farklılaşma elde edilememektedir.

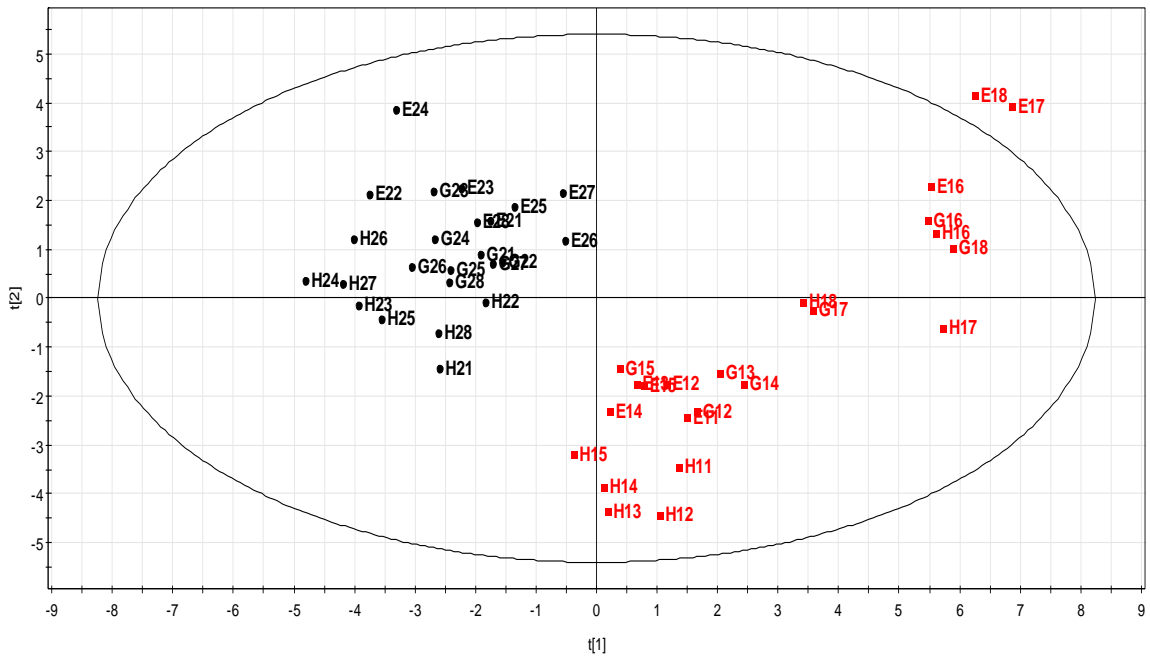
a)



b)



c)



Şekil 20. Erkençe, Hurma ve Gemlik zeytinlerinin iki hasat yılının 8 haftalık örnekleme sürecine ait a) şeker + organik asit (3 asal bileşen, $R^2 = 0,64$), b) şeker+ yağ asidi (4 asal bileşen, $R^2 = 0,61$) ve c) şeker + organik asit + yağ asidi + fenol + toplam fenol verileri (3 asal bileşen, $R^2 = 0,41$) ile oluşturulan PCA modellerinin skor grafikleri

4.2. Mikrobiyolojik Karakterizasyon

4.2.1. Mikrobiyolojik Sayım Sonuçları

İki hasat sezonunda olgunlaşma dönemi boyunca toplanan Hurma, Erkence ve Gemlik tipi zeytinlerin mikrobiyal florasının incelenmesi sonucu elde edilen toplam canlı, maya ve küf, *Enterobacteriaceae* sayıları Şekil 21-23 verilmiştir. Hurma ve Gemlik zeytinlerinin ve yapraklarının ayrıca zeytinliklerin hava örneklerine 2 yıllık olgunlaşma dönemi boyunca elde edilen mikrobiyolojik analiz sonuçları Tablo 13-19'da verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 2011 ve 2012 yıllarındaki olgunlaşma dönemi boyunca toplanan Hurma zeytinin aerobik mezofilik toplam canlı sayıları başlangıçta 10^{3-4} seviyesindedir. 2011 yılında başlangıçtaki bu sayı olgunlaşma süresinin sonunda 10^7 seviyesine ulaşırken 2012 yılında 10^{4-5} arasında değişmiştir (Şekil 21). Genel olarak Gemlik ve hurmalaşmayan Erkence zeytinlerinin aerobik toplam canlı sayılarının Hurma zeytinin aerobik toplam canlı sayısına kıyasla daha düşük olduğu saptanmıştır.

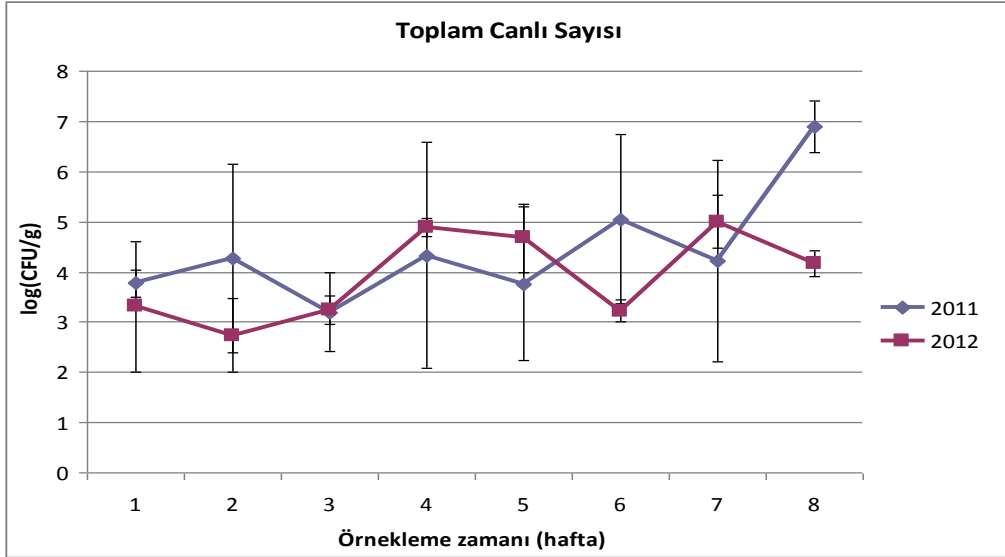
Genel olarak Hurma zeytinde 2011 ve 2012 hasat yıllarında olgunlaşma sürecinde küf ve maya sayılarının paralellik gösterdiği görülmektedir. Küf ve maya sayımında kullanılan farklı besiyerlerinin bu mikroorganizmaların sayılarının belirlenmesinde örnek tipine ve örnekleme zamanına bağlı olarak farklılık gösterdiği görülmektedir (Şekil 24).

Erkence (hurmalaşan ve hurmalaşmayan) ve Gemlik zeytin çeşitlerinin bahçelerinden alınan hava örneklerinde 2011 yılında *Enterobacteriaceae* saptanmasına karşılık 2012 yılında saptanmamıştır. Ayrıca 2012 yılında olgunlaşma dönemi boyunca aerobik toplam canlı sayısı küf ve maya sayısına yaklaşık olarak eşit sayılacak düzeylerde iken 2011 yılında aerobik toplam canlı sayısı, maya ve küf sayısına kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç 2012 yılında *Enterobacteriaceae* saptanmamasını açıklamaktadır. Maya ve küf sayısının daha yoğunlukta olduğu 2012 yılında bu mikroorganizmaların *Enterobacteriaceae* üzerindeki baskılayıcı etkisinin bir sonucu olabilir. Benzer durum Erkence ve Gemlik zeytinlerinde ve bu zeytin çeşitlerinin yaprak örneklerinde de gözlenmiştir. Ancak bu durumun aksine Hurma zeytinde *Enterobacteriaceae* iki hasat yılında da saptanmıştır. Hurma zeytinde olgunlaşma sürecinde başlangıçta düşük sayıda olan *Enterobacteriaceae* sayısı giderek artmış, sonuçta elde edilen sayı Erkence ve Gemlik zeytinlerine kıyasla daha yüksek olmuştur (Şekil 23).

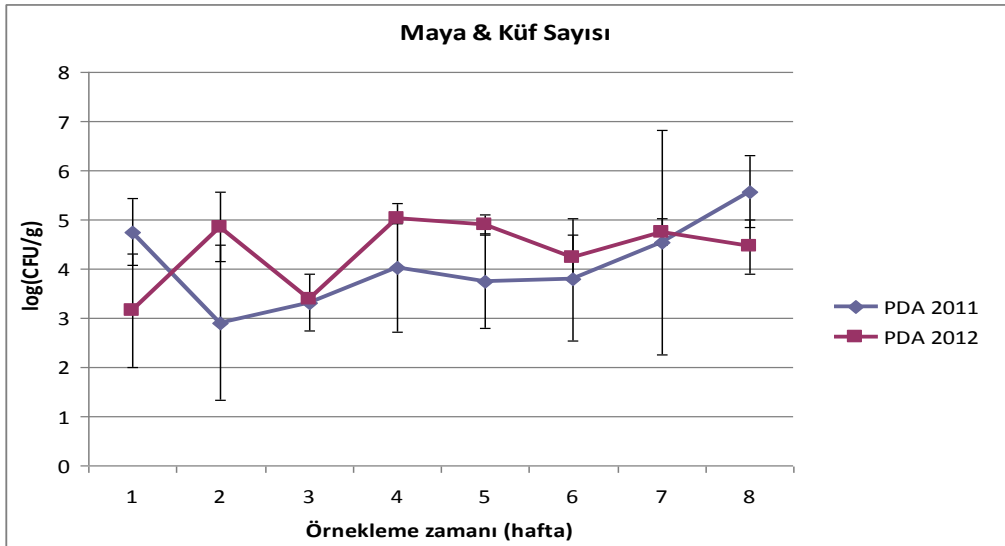
Toplam canlı sayısı Hurma ve Gemlik zeytinlerinin her ikisinde de artış göstermesine karşılık Hurma zeytindeki canlı sayısı Gemlik'e göre yaklaşık olarak 2 log daha düşüktür. Gemlik ve Hurma zeytinde küf popülasyonundaki artış paralellik göstermekle birlikte Hurma zeytinde *Enterobacteriaceae* sayısı oldukça yüksek saptanmıştır. Olgunlaşma periyodunda maya ve küf sayımında kullanılan farklı besiyerlerinde gelişen ve izole edilen küflerin morfolojileri açısından farklılıklar gösterdiği görülmüştür (Şekil 24). Olgunlaşma sırasında

Hurma zeytin yaprağında mikrobiyal popülasyon 5-6 log₁₀ arasında değişirken Gemlik zeytin yaprağında başlangıçta düşük olan (~2,5 log₁₀) popülasyon artış göstererek ~6 log₁₀ değerine ulaşmıştır (Tablo 18-19).

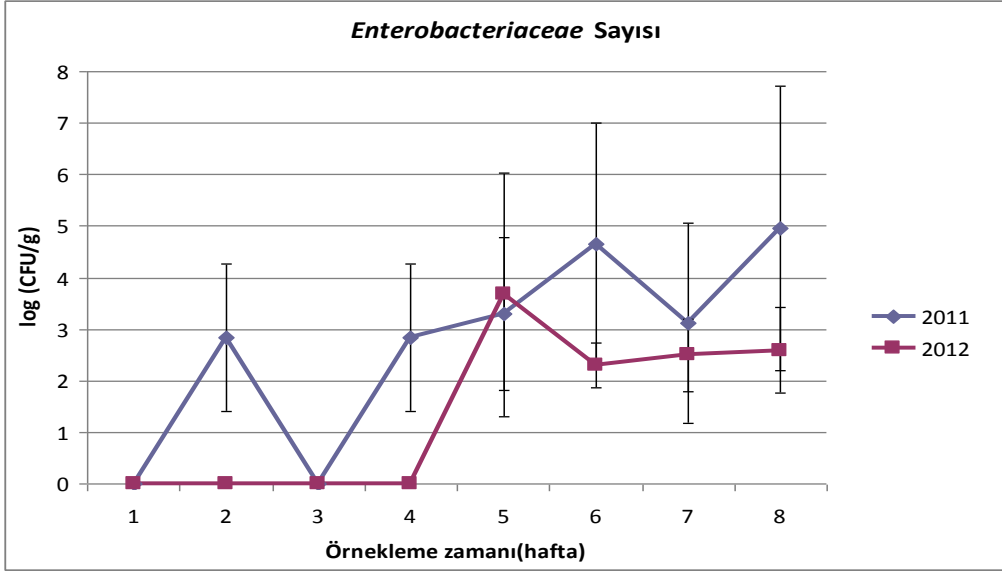
Hurma, Erkence ve Gemlik zeytinleri ile bu çeşitlerin yapraklarında seçici/ayırt edici besiyerlerinde gerçekleştirilen plak sayım sonunda *Pseudomonads*, *Staphylococci*, *Micrococci* ve *Lactobacilli* saptanamamıştır (Tablo 13-15 ve 18-19).



Şekil 21. 2011-2012 hasat yıllarında olgunlaşma sürecinde Hurma zeytinlerinin toplam canlı sayılarındaki değişim



Şekil 22. 2011-2012 hasat yıllarında olgunlaşma sürecinde Hurma zeytinlerinin maya ve küf sayılarındaki değişim (PDA besiyerinden elde edilen sayım sonuçları kullanılmıştır)



Şekil 23. 2011-2012 hasat yıllarında olgunlaşma sürecinde Hurma zeytinlerinin *Enterobacteriaceae* sayılarındaki değişim

Tablo 13. Hurma zeytinin mikrobiyolojik analiz (log CFU/g) sonuçları *

Mikrobiyal grup	Örnekleme zamanı (gün)							
	0	7	14	21	28	35	42	49
2011								
Toplam aerobik mezofilik	3.77±0.26 ^{a cd}	4.26±1.86 ^a	3.20±0.78 ^{a b}	4.32±2.25 ^a	3.76±1.53 ^a	5.05±1.67 ^a	4.20±2.00 ^a	6.89±0.52 ^a
Küf ve Maya								
PDA-2011	4.75±0.67 ^{a d}	2.90±1.57 ^a	3.31±0.58 ^{a b}	4.02±1.31 ^a	3.75±0.95 ^a	3.78±1.23 ^a	4.52±2.28 ^a	5.57±0.71 ^a
OA-2011	3.32±0.13 ^{ab bc}	2.80±1.39 ^a	3.48±0.63 ^{ab b}	3.87±1.02 ^{ab b}	4.09±1.03 ^{ab a}	4.32±1.44 ^{ab a}	3.74±1.63 ^{ab a}	6.30±1.42 ^{b a}
SDA-2011	2.46±0.79 ^{a b}	3.39±1.08 ^{ab a}	3.70±0.67 ^{ab b}	3.93±1.78 ^{ab a}	3.62±1.44 ^{ab a}	4.59±1.57 ^{ab a}	4.68±2.35 ^{ab a}	6.54±0.28 ^{b a}
CZA-2011	3.26±0.05 ^{a bc}	3.83±0.55 ^a	4.12±1.18 ^{a b}	3.56±1.36 ^a	4.09±1.11 ^a	4.48±1.73 ^a	4.46±2.14 ^a	6.45±1.12 ^a
<i>Enterobacteriaceae</i>	<100 cfu/g ^a	2.85±1.4 ^{ab a}	<100 cfu/g ^a	2.82±1.43 ^{ab a}	3.29±1.47 ^{ab a}	4.65±2.35 ^{ab a}	3.11±1.93 ^{ab a}	4.95±2.76 ^{b a}
Pseudomonads	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Staphylococci	& <100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Micrococci								
Lactobacilli	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g
2012								
Toplam aerobik mezofilik	3.30±1.30 ^{ab b}	2.73±0.73 ^{a b}	3.23±0.28 ^{ab b}	4.88±0.19 ^{b b}	4.68±0.68 ^{b a}	3.22±0.22 ^{ab ab}	5.00±0.52 ^{b b}	4.16±0.26 ^{ab b}
Küf ve Maya								
PDA-2012	3.15±1.50 ^{a b}	4.48±0.71 ^{bc c}	3.39±0.09 ^{ab b}	5.01±0.09 ^{c b}	4.90±0.20 ^{bc a}	4.23±0.46 ^{abc bc}	4.75±0.27 ^{bc b}	4.45±0.54 ^{abc b}
OA-2012	3.52±1.52 ^{a b}	5.07±0.44 ^{a c}	3.73±0.03 ^{a b}	4.82±0.34 ^{a b}	4.88±0.28 ^{a a}	4.95±0.34 ^{a c}	4.68±0.38 ^{a b}	4.12±0.34 ^{a b}
SDA-2012	3.69±0.79 ^{ab b}	4.40±0.08 ^{abc c}	3.34±0.26 ^{a b}	4.73±0.26 ^{abc b}	4.49±1.21 ^{abc a}	5.09±0.05 ^{bc c}	5.88±0.19 ^{c b}	4.21±0.26 ^{ab b}
CZA-2012	4.03±0.43 ^{a b}	4.07±0.47 ^{a bc}	3.25±0.34 ^{a b}	4.72±0.42 ^{a b}	4.10±0.90 ^{a a}	4.18±0.87 ^{a bc}	4.95±0.95 ^{a b}	4.32±0.15 ^{a b}
<i>Enterobacteriaceae</i>	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	3.67±1.67 ^{b a}	2.30±0.30 ^{b a}	2.50±0.50 ^{b a}	2.58±0.58 ^{b a}
Pseudomonads	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Staphylococci	& <100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Micrococci								
Lactobacilli	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g

* Sonuçlar ortalama olarak verilmiştir. Parantez içindeki değerler standart sapma değerleridir

Tablo 14. Erkençe zeytinin mikrobiyolojik analiz (log CFU/g) sonuçları*

Mikrobiyal grup	Örnekleme zamanı (gün)							
	0	7	14	21	28	35	42	49
2011								
Toplam aerobik mezofilik	4.04±0.51 ^a	2.85±0.49 ^a	3.04±0.65 ^a	4.14±1.01 ^a	2.65±0.52 ^a	2.66±0.77 ^a		
Küf ve Maya								
PDA-2011	3.49±0.25 ^a	2.62±0.55 ^a	3.59±0.65 ^a	3.44±1.28 ^a	2.49±0.35 ^a	2.96±0.69 ^a		
OA-2011	2.89±0.87 ^a	2.60±1.04 ^a	3.31±0.79 ^a	3.65±1.43 ^a	3.01±0.18 ^a	3.37±0.40 ^a		
SDA-2011	3.52±0.11 ^a	3.49±0.43 ^a	3.47±0.42 ^a	3.80±1.57 ^a	3.39±0.39 ^a	2.79±0.25 ^a		
CZA-2011	2.49±0.85 ^a	2.83±0.75 ^a	3.38±0.36 ^a	4.11±1.89 ^a	3.05±0.16 ^a	3.09±0.69 ^a		
<i>Enterobacteriaceae</i>	2.81±0.57 ^b	<100 cfu/g ^a	2.63±1.92 ^b	3.20±1.83 ^b	2.35±0.39 ^{ab}	2.23±0.40 ^{ab}		
Pseudomonads	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g		
Staphylococci & Micrococci	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g		
Lactobacilli	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g		
2012								
Toplam aerobik mezofilik	2.20±0.34 ^a	2±0 ^a	2.15±0.21 ^a	2.73±0.36 ^a	3.37±0.36 ^a	2.65±0.91 ^a	2.38±0.55 ^a	3.96±2.77 ^a
Küf ve Maya								
PDA-2012	2.86±1.02 ^a	2.47±0.67 ^a	3.27±0.60 ^a	2.50±0.70 ^a	2.86±0.51 ^a	2.23±0.33 ^a	3.59±0.73 ^a	2.62±0.21 ^a
OA-2012	3.59±0.25 ^{abc}	3.96±0.26 ^{bc}	4.62±0.46 ^c	4.40±0.21 ^c	2.65±0.75 ^a	3.08±0.55 ^{ab}	3.32±0.02 ^{ab}	5.78±0.59 ^d
SDA-2012	2.96±0.63 ^{ab}	2.84±1.20 ^{ab}	2.57±0.81 ^{ab}	2.15±0.21 ^a	2.87±0.92 ^{ab}	2.38±0.12 ^a	3.56±0.07 ^{ab}	4.34±1.47 ^b
CZA-2012	4.11±0.80 ^{ab}	2.88±0.83 ^{ab}	2.84±1.20 ^{ab}	2.33±0.57 ^a	2.65±0.75 ^{ab}	2.15±0.21 ^a	2.83±0.28 ^{ab}	4.72±1.42 ^b
<i>Enterobacteriaceae</i>	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a
Pseudomonads	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Staphylococci & Micrococci	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Lactobacilli	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g

* Sonuçlar ortalama olarak verilmiştir. Parantez içindeki değerler standart sapma değerleridir

Tablo 15. Gemlik zeytinin mikrobiyolojik analiz (log CFU/g) sonuçları*

Mikrobiyal grup	Örnekleme zamanı (gün)							
	0	7	14	21	28	35	42	49
2011								
Toplam aerobik mezofilik		2.15±0.15 ^a	2.23±0.23 ^{ab}	2.80±0.19 ^{abc}	3.06±0.11 ^{bc}	2.45±0.15 ^{abc}	3.15±0.15 ^c	4.69±0.08 ^d
Küf ve Maya								
PDA-2011		4.25±0.04 ^{de}	3.58±0.11 ^{bc}	3.14±0.10 ^{ab}	4.45±0.05 ^e	4.45±0.05 ^e	4.06±0.11 ^{cd}	3.95±0.04 ^{cd}
OA-2011		2.15±0.15 ^a	2.34±0.34 ^a	2.84±0.06 ^{ab}	4.18±0.07 ^c	3.77±0.17 ^{bc}	3.76±0.16 ^{bc}	4.06±0.11 ^c
SDA-2011		2.23±0.23 ^a	2.38±0.38 ^a	2.91±0.03 ^{ab}	4.66±0.07 ^d	3.69±0.21 ^{bc}	4.70±0.11 ^{de}	3.92±0.07 ^{bc}
CZA-2011		2.30±0.30 ^a	2.34±0.34 ^a	3.01±0.06 ^{ab}	3.74±0.06 ^{bc}	2.38±0.38 ^a	4.86±0.08 ^e	4.08±0.08 ^{bc}
<i>Enterobacteriaceae</i>		2.15±0.15 ^b	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	2.30±0.30 ^b	3.30±0.60 ^b	2.15±0.15 ^b	2.23±0.23 ^b
Pseudomonads		<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Staphylococci & Micrococci		<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Lactobacilli		<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g
2012								
Toplam aerobik mezofilik	2.23±0.23 ^a	2.80±0.10 ^{ab}	3.38±0.12 ^{ab}	2.47±0.47 ^a	4.28±0.41 ^b	3.45±0.15 ^{ab}	2.57±0.27 ^{ab}	2.57±0.27 ^{ab}
Küf ve Maya								
PDA-2012	3.80±0.10 ^{bc}	3.75±0.15 ^{bc}	4.19±0.11 ^c	2.45±0.45 ^a	5.28±0.03 ^d	2.77±0.17 ^{ab}	2.82±0.12 ^{ab}	3.75±0.05 ^{bc}
OA-2012	2.83±0.13 ^a	3.94±0.03 ^b	4.64±0.10 ^c	3.45±0.15 ^{ab}	5.51±0.14 ^d	3.75±0.15 ^b	3.07±0.07 ^a	4.91±0.06 ^{cd}
SDA-2012	5.02±0.02 ^c	3.88±0.11 ^b	3.08±0.08 ^{ab}	2.47±0.47 ^a	5.44±0.06 ^c	3.15±0.15 ^{ab}	3.29±0.18 ^{ab}	3.31±0.03 ^{ab}
CZA-2012	3.99±0.09 ^{bc}	2.97±0.02 ^{ab}	4.87±0.02 ^{cd}	2.50±0.50 ^a	5.47±0.06 ^d	3.82±0.12 ^{bc}	3.37±0.32 ^{ab}	3.97±0.02 ^{bc}
<i>Enterobacteriaceae</i>	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a	<100 cfu/g ^a
Pseudomonads	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Staphylococci & Micrococci	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Lactobacilli	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g

* Sonuçlar ortalama olarak verilmiştir. Parantez içindeki değerler standart sapma değerleridir

Tablo 16. Hurma-Erkence zeytin bahçesinin hava örneklerinin mikrobiyolojik analiz (log CFU/m³) sonuçları*

Mikrobiyal grup	Örnekleme zamanı (gün)							
	0	7	14	21	28	35	42	49
2011								
Toplam aerobik mezofilik	2.39±0.12 ^d _c	1.57±0.03 ^b _b	1.84±0.23 ^{bc} _c	1.86±0.12 ^{bcd} _c	2.19±0.15 ^{dc} _c	1.92±0.15 ^{bcd} _b	1.71±0.02 ^{bc} _c	0.53±0.08 ^a _b
Küf ve Maya	1.13±0.02 ^{ab} _b	2.17±0.20 ^c _c	1.20±0.07 ^{ab} _b	1.15±0.06 ^{ab} _b	1.50±0.05 ^b _b	1.00±0.14 ^a _a	1.06±0.15 ^{ab} _b	0.89±0.07 ^a _c
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.38±0.12 ^b _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0.53±0.08 ^{bc} _a	0.72±0.17 ^c _a	0 ^a _a	0 ^a _a
2012								
Toplam aerobik mezofilik	1.83±0.06 ^{bc} _b	1.99±0.13 ^c _c	1.44±0.19 ^b _a	2.19±0.02 ^c _c	2.04±0.04 ^c _c	1.35±0.10 ^b _c	0.45±0.21 ^a _a	2.09±0.10 ^c _c
Küf ve Maya	1.06±0.51 ^a _{ab}	1.45±0.08 ^a _b	1.18±0.68 ^a _a	1.41±0.12 ^a _b	1.35±0.08 ^a _b	0.77±0.10 ^a _b	0.58±0.15 ^a _a	1.61±0.16 ^a _b
<i>Enterobacteriaceae</i>	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a

* Sonuçlar ortalama olarak verilmiştir. Parantez içindeki değerler standart sapma değerleridir.

Tablo 17. Gemlik zeytin bahçesinin hava örneklerinin mikrobiyolojik analiz (log CFU/m³) sonuçları*

Mikrobiyal grup	Örnekleme zamanı (gün)							
	0	7	14	21	28	35	42	49
2011								
Toplam aerobik mezofilik		1.44±0.51 ^a _a	1.50±0.06 ^a _b	1.96±0.15 ^a _b	2.07±0.45 ^a _a	1.75±0.06 ^a _b	1.76±0.12 ^a _c	1.68±0.18 ^a _b
Küf ve Maya		1.90±0.80 ^a _a	1.32±0.07 ^a _b	1.30±0.13 ^a _{ab}	1.58±0.05 ^a _a	1.45±0.05 ^a _b	1.06±0.15 ^a _b	1.25±0.06 ^a _{ab}
<i>Enterobacteriaceae</i>		0 ^a _a	0 ^a _a	0.94±0.23 ^{bc} _a	1.38±0.21 ^c _a	0.15±0.21 ^a _a	0 ^a _a	0.62±0.21 ^{ab} _a
2012								
Toplam aerobik mezofilik	0.84±0.21 ^{ab} _b	1.65±0.08 ^b _b	1.82±0.07 ^b _b	1.70±0.06 ^b _b	1.55±0.10 ^b _b	1.14±0.04 ^b _b	0.50±0.28 ^a _a	0.45±0.63 ^a _a
Küf ve Maya	0.82±0.18 ^a _b	1.46±0.01 ^{bc} _b	1.70±0.19 ^c _b	1.54±0.11 ^c _b	1.20±0.17 ^{abc} _b	0.72±0.17 ^a _b	0.89±0.07 ^a _b	0.97±0.09 ^{ab} _a
<i>Enterobacteriaceae</i>	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a	0 ^a _a

* Sonuçlar ortalama olarak verilmiştir. Parantez içindeki değerler standart sapma değerleridir.

Tablo 18. Erkence zeytin yapraklarının mikrobiyolojik analiz (log CFU/g) sonuçları*

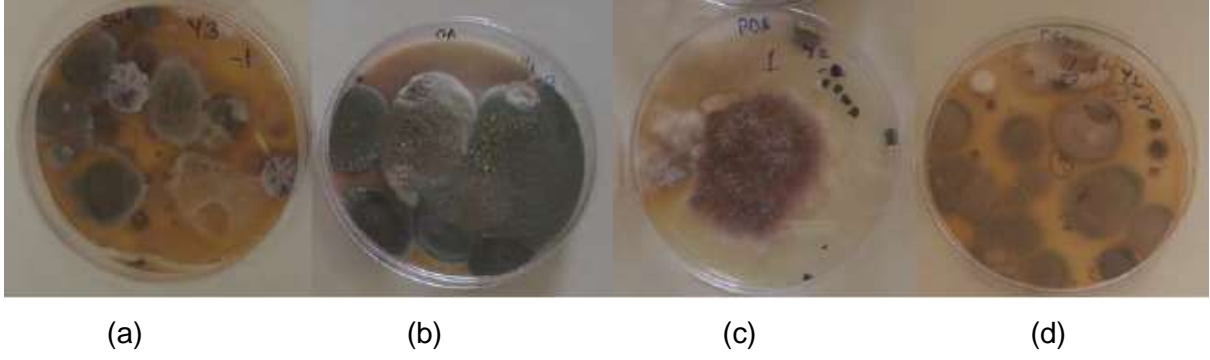
Mikrobiyal grup	Örnekleme zamanı (gün)							
	0	7	14	21	28	35	42	49
2011								
Toplam aerobik mezofilik	4.04±0.42 ^{ab} _a	3.69±0.52 ^a _b	4.97±2.06 ^{ab} _b	4.67±0.22 ^{ab} _a	4.03±0.66 ^{ab} _a	5.06±0.83 ^{ab} _b	5.50±1.06 ^{ab} _b	6.39±0.05 ^b _b
Küf ve Maya								
PDA-2011	4.81±0.55 ^{cd} _a	2.85±0.20 ^a _b	2.99±0.87 ^a _b	3.13±0.72 ^{ab} _a	3.62±0.55 ^{abc} _a	4.17±0.74 ^{abc} _b	4.71±0.46 ^{bcd} _b	5.95±0.18 ^d _b
OA-2011	4.78±0.50 ^{ab} _a	3.38±0.08 ^a _b	3.91±0.98 ^a _b	4.81±0.43 ^{ab} _a	4.07±0.90 ^a _a	4.65±0.60 ^{ab} _b	4.92±0.47 ^{ab} _b	5.96±0.11 ^b _b
SDA-2011	4.42±0.25 ^{ab} _a	3.62±0.25 ^a _b	4.41±1.07 ^{ab} _b	4.75±0.31 ^{ab} _a	4.40±0.99 ^{ab} _a	4.60±1.11 ^{ab} _b	4.81±0.14 ^{ab} _b	5.99±0.10 ^b _b
CZA-2011	4.32±0.08 ^{ab} _a	3.14±0.66 ^a _b	4.11±0.85 ^{ab} _b	5.21±0.32 ^b _a	4.17±1.17 ^{ab} _a	4.68±1.00 ^{ab} _b	5.21±0.44 ^b _b	5.79±0.57 ^b _b
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.77±0.26 ^b _a	<100 cfu/g ^a _a	<100 cfu/g ^a _a	3.02±1.76 ^b _a	2.39±0.67 ^b _a	<100 cfu/g ^a _a	<100 cfu/g ^a _a	<100 cfu/g ^a _a
Pseudomonads	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Staphylococci & Micrococci	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Lactobacilli	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g
2012								
Toplam aerobik mezofilik	2.40±0.34 ^a _b	3.79±0.50 ^b _b	3.63±0.53 ^{ab} _{bc}	3.54±0.28 ^{ab} _b	3.18±0.77 ^{ab} _{bc}	2.50±0.17 ^{ab} _b	3.21±0.40 ^{ab} _b	3.41±0.49 ^{ab} _b
Küf ve Maya								
PDA-2012	2.63±0.35 ^a _b	3.47±0.05 ^b _b	2.94±0.55 ^{ab} _b	3.34±0.28 ^{ab} _b	2.84±0.15 ^{ab} _b	3.12±0.20 ^{ab} _b	3.39±0.15 ^{ab} _b	3.04±0.08 ^{ab} _{ab}
OA-2012	3.00±0.41 ^a _b	4.55±1.32 ^a _b	4.38±0.20 ^a _c	3.78±0.68 ^a _b	4.02±0.33 ^a _c	3.94±0.70 ^a _b	3.88±0.06 ^a _b	3.63±0.05 ^{ac} _b
SDA-2012	3.38±0.94 ^a _b	3.38±0.94 ^a _b	3.86±0.42 ^a _{bc}	3.86±0.42 ^a _b	3.35±0.42 ^a _{bc}	3.62±0.59 ^a _b	3.97±0.68 ^a _b	3.68±0.63 ^a _b
CZA-2012	3.10±0.45 ^a _b	4.49±0.41 ^a _b	3.71±0.66 ^a _{bc}	3.36±0.93 ^a _b	3.89±0.23 ^a _{bc}	3.68±1.05 ^a _b	4.12±0.21 ^a _b	3.35±0.59 ^a _b
<i>Enterobacteriaceae</i>	<100 cfu/g ^a _a	100 cfu/g ^a _a	<100 cfu/g ^a _a	<100 cfu/g ^a _a	<100 cfu/g ^a _a	<100 cfu/g ^a _a	<100 cfu/g ^a _a	<100 cfu/g ^a _a
Pseudomonads	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Staphylococci & Micrococci	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Lactobacilli	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g

* Sonuçlar ortalama olarak verilmiştir. Parantez içindeki değerler standart sapma değerleridir

Tablo 19. Gemlik zeytin yapraklarının mikrobiyolojik analiz (log CFU/g) sonuçları*

Mikrobiyal grup	Örnekleme zamanı (gün)								
	2011	0	7	14	21	28	35	42	49
Toplam aerobik mezofilik			2.80±0.10 ^{ab} _a	2.45±0.15 ^a _b	3.78±0.16 ^{bc} _b	2.55±0.55 ^{ab} _a	4.95±0.04 ^{cd} _d	5.33±0.05 ^d _{cd}	6.18±0.11 ^d _b
Küf ve Maya									
PDA-2011			4.12±0.04 ^{bc} _b	2.34±0.34 ^a _b	2.53±0.11 ^a _b	3.46±0.08 ^b _{ab}	4.89±0.06 ^c _{cd}	4.93±0.06 ^c _{bc}	6.25±0.12 ^d _b
OA-2011			2.34±0.34 ^a _a	2.38±0.38 ^a _b	2.50±0.24 ^a _b	4.07±0.12 ^b _b	4.38±0.15 ^{bc} _{bc}	4.58±0.11 ^{bc} _b	5.52±0.18 ^c _b
SDA-2011			2.95±0.04 ^{ab} _a	2.34±0.34 ^a _b	2.71±0.12 ^{ab} _b	3.30±0.07 ^b _{ab}	4.81±0.04 ^c _{cd}	5.18±0.13 ^c _{cd}	6.26±0.12 ^d _b
CZA-2011			2.97±0.02 ^{ab} _a	2.53±0.23 ^a _b	2.98±0.54 ^{ab} _b	4.27±0.12 ^{bc} _b	3.92±0.07 ^b _b	5.48±0.03 ^c _d	5.58±0.11 ^c _b
<i>Enterobacteriaceae</i>			2.30±0.30 ^b _a	<100 cfu/g ^a _a	<100 cfu/g ^a _a	2.15±0.15 ^b _a	2.15±0.15 ^b _a	2.86±0.08 ^b _a	2.23±0.23 ^b _a
Pseudomonads			<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Staphylococci & Micrococci			<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g
Lactobacilli			<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g
2012	0	7	14	21	28	35	42	49	
Toplam aerobik mezofilik	2.58±0.11 ^a _b	3.34±0.14 ^{ab} _b	2.77±0.17 ^a _b	2.92±0.15 ^a _b	3.23±0.23 ^{ab} _b	2.95±0.04 ^a _b	3.95±0.12 ^b _b	3.78±0.02 ^b _b	
Küf ve Maya									
PDA-2012	2.30±0.30 ^a _b	5.24±0.27 ^d _c	3.23±0.23 ^{abc} _{bc}	2.73±0.26 ^a _b	4.41±0.23 ^{cd} _{cd}	2.97±0.02 ^{ab} _b	4.55±0.06 ^d _c	4.19±0.19 ^{bcd} _{bc}	
OA-2012	2.97±0.19 ^{ab} _b	4.49±0.13 ^d _c	2.69±0.21 ^a _b	3.45±0.15 ^{abc} _b	3.99±0.04 ^{cd} _{bc}	3.38±0.08 ^{abc} _{bc}	4.78±0.08 ^d _c	3.63±0.17 ^{bc} _b	
SDA-2012	2.66±0.18 ^a _b	4.64±0.16 ^d _c	3.34±0.19 ^{ab} _{bc}	2.89±0.05 ^a _b	4.95±0.04 ^d _d	3.76±0.11 ^{bc} _c	4.76±0.11 ^d _c	4.26±0.12 ^{cd} _{bc}	
CZA-2012	2.98±0.15 ^a _b	4.75±0.08 ^c _c	3.92±0.07 ^b _c	2.72±0.12 ^a _b	3.34±0.08 ^{ab} _b	3.71±0.18 ^b _c	4.68±0.08 ^c _c	4.59±0.09 ^c _b	
<i>Enterobacteriaceae</i>	<100 cfu/g _a	<100 cfu/g _a	<100 cfu/g _a	<100 cfu/g _a	<100 cfu/g _a	<100 cfu/g _a	<100 cfu/g _a	<100 cfu/g _a	
Pseudomonads	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	
Staphylococci & Micrococci	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	<100 cfu/g	
Lactobacilli	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	

* Sonuçlar ortalama olarak verilmiştir. Parantez içindeki değerler standart sapma değerleridir



Şekil 24. Maya ve küf sayımında kullanılan farklı besiyerlerinde gelişen küflerin morfolojileri a) saboraaud agar b) oatmeal agar c) potato dextrose agar d) czapeck yeast agar

4.2.2. Bakteri İzolatlarının Tanımlanması

İlk hasat yılında (2011) olgunlaşma sürecinde Hurma ve Gemlik zeytinleri ve yapraklarından ve zeytinliklerde havadan izole edilen 166 bakterinin, gram boyamaları ve katalaz testleri sonucunda 91'i gram negatif çubuk, 57'si gram pozitif çubuk ve 18'inin ise gram pozitif kok olduğu belirlenmiştir. İlk hasat yılında olgunlaşma sürecinde Hurma ve Gemlik zeytinleri, yaprakları ve bahçelerindeki hava örneklerinden gram negatif kok bakteri izole edilmemiştir. İkinci hasat yılında (2012) ise Hurma ve Gemlik zeytinleri ve yapraklarından ve ayrıca zeytinliklerde havadan izole edilen toplam 173 bakterinin 69'u gram negatif çubuk, 93'ü gram pozitif çubuk, 9'unun gram negatif kok ve 2'sinin ise gram pozitif kok olduğu belirlenmiştir (Tablo 20).

Sonuç olarak tanımlama amacıyla, çeşitli besiyerlerinde gelişen tüm kolonilerden 192 bakteri, 48 maya ve 461 küf izole edilmiştir. Bu kolonilerden hurma zeytinden 90 (%37,5) izolat (58 bakteri, 32 maya), zeytin yaprak örneklerinden 76 (%31,67) izolat (60 bakteri, 16 maya) ve hava örneklerinden ise 74 (%30,83) bakteri kolonisi izole edilmiştir. Hurma zeytinden 126 (%22,3), zeytin yaprağı örneklerinden 189 (%41) ve hava örneklerinden ise 83 (%18) küf izolatu elde edilmiştir.

Tablo 20. 2011 ve 2012 hasat yıllarına ait olgunlaşma sürecinde Hurma ve Gemlik zeytinleri, yaprakları ve bahçelerindeki hava kaynaklı bakteri izolat sayıları

2011 Hasat Yılı Bakteri İzolat Sayıları								
Bakteri şekil/gram rxn.	Yaprak	Hurma		Gemlik		Hava		Toplam
		Zeytin	Hurma	Yaprak	Zeytin	Eğlenhoca (Hurma)	İYTE (Gemlik)	
Bacilli/Gram–	14	16	25		5	18	13	91 (%54.81)
Bacilli/Gram +	22	2	1	2		11	19	57 (%34.33)
Cocci/Gram –								
Cocci/Gram +	8	2	4			3	1	18 (%10.84)
Toplam	44 (%26.5)	20 (%12.04)	30 (%18.07)	2 (%1.20)	5 (%3.01)	32 (%19.27)	33 (%19.87)	166
2012 Hasat Yılı Bakteri İzolat Sayıları								
Bakteri şekil/gram rxn.	Yaprak	Hurma		Gemlik		Hava		Toplam
		Zeytin	Hurma	Yaprak	Zeytin	Eğlenhoca (Hurma)	İYTE (Gemlik)	
Bacilli/Gram–	20		9	4	1	16	19	69 (%39.88)
Bacilli/Gram +	28	4	2	9	2	29	19	93 (%53.75)
Cocci/Gram –	3	2	1			2	1	9 (%5.2)
Cocci/Gram +	2							2 (%1.1)
Toplam	53 (%30)	6 (%3.4)	12 (%6.93)	13 (%7.51)	3 (%1.73)	47 (%27.16)	39 (%22.5)	173

Olgunlaşma periyodu boyunca, küf popülasyonunun giderek arttığı gözlenmiştir. İzole edilen bakteri ve mayalar karakterizasyon amacıyla morfolojik özelliklerini belirlemek için faz kontrast mikroskopunda incelenmiştir.

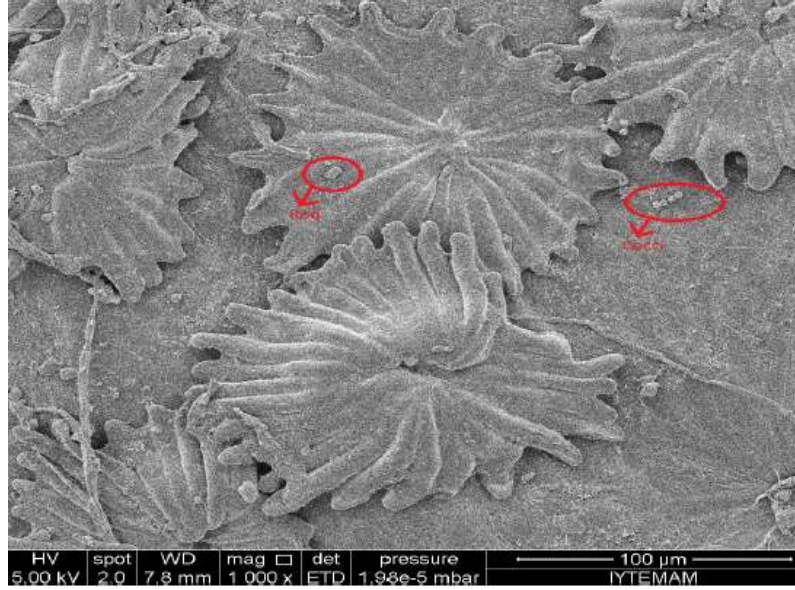
2011-2012 hasat yıllarında olgunlaşma sürecinde Hurma ve Erkence zeytinleri, yaprakları ve bahçelerindeki hava kaynaklı bakteri izolatlarının biyokimyasal ve moleküler tanımlama sonuçları Tablo 21’de verilmiştir.

Tablo 21. 2011-2012 hasat yıllarında olgunlaşma sürecinde Hurma ve Erkençe zeytinleri, yaprakları ve bahçelerindeki hava kaynaklı bakteri izolatlarının biyokimyasal ve moleküler tanımlama sonuçları

Bakteri İzolat Kodu	İzolatin Kaynağı	Biyokimyasal Tanımlama Sonucu	Moleküler Tanımlama Sonucu		
			Genus/Species	MAX ID (%)	GenBank
2011					
1 (1-26)	HO	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus simplex</i>	100	KC936232
2 (2-19)	HO	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98	KC593550
3 (5-4)	HO	Unidentified	<i>Acinetobacter sp.</i>	93	HQ449642
4 (7-13)	HO	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	99	HM804387
5 (8-20)	HO	<i>Neisseria sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	HQ403168
6 (1-10)	HL	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus simplex</i>	98	KC936232
7 (3-17)	HL	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	98	HF952653
8 (4-28)	HL	<i>Bacillus cereus.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	100	AM910170
9 (6-29)	HL	Unidentified	<i>Arthrobacter sp.</i>	100	KC522130
10 (6-31)	HL	Unidentified	<i>Pantoea sp.</i>	99	JX908928
11 (7-2)	HL	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	100	JF903932
12 (2-35)	ERK	<i>Enterobacter intermedius</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	99	KC178591
13 (2V-2)	ERK	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98	JX267073
14 (5A-9)	EH	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	GQ169102
15 (6A-7)	EH	Unidentified	<i>Arthrobacter sp.</i>	99	KC522130
2012					
16 (3-23)	HO	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99	GQ392055
17 (5-1)	HO	Unidentified	<i>Pantoea sp.</i>	100	JN853224
18 (6-15)	HO	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	JX069939
19 (2-4)	HL	Unidentified	<i>Curtobacterium sp.</i>	100	KC466122
20 (3-24)	HL	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	HQ858064
21 (7-10)	HL	Unidentified	<i>Brevibacterium sp.</i>	100	KC466227
22 (8-1)	HL	<i>Bacillus cereus</i>	Unidentified		
23 (8-12)	HL	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	100	KC492525
24 (1-7)	ERK	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus sp.</i>	100	DQ659067
25 (8-21)	ERK	Unidentified	<i>Pantoea sp. Erwinia sp.</i>	100	KC252899
26 (2A-6)	EH	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	100	GQ392049
27 (2A-23)	EH	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus litoralis</i>	95	JF411239
28 (3A-10)	EH	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	99	JX274543
29 (3A-15)	EH	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus sp.</i>	99	HM804387

HO: Hurma zeytini, ERK: Erkence zeytini, HL: Hurma zeytin yaprağı, EH; Hurma-Erkence bahçesi hava örneği

Şekil 24'te hurma zeytin yaprağının SEM görüntüsü verilmiştir. Görüntüde çubuk ve kok şeklindeki bakteriler açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 24. Hurma zeytin yaprağının SEM görüntüsü

Elde edilen sonuçlar biyokimyasal ve moleküler yöntemin her ikisinin de tanımlama etkinliğinin benzer olduğunu göstermektedir. İzolatların sayım sonuçları ile uyum gösterdiği ifade edilebilir şöyle ki laktik asit bakteri türleri ve *Pseudomonas* türleri saptanmamış ve izolatlardan da bu şekilde bir tanımlama sonucu elde edilmemiştir. Ancak bu durumun tersine *Staphylococci* ve *Micrococci* sayım sonuçlarında negatif olmakla birlikte izolatlar arasında *Staphylococcus* türü, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus varians* olduğu gözlenmiştir. Bu söz konusu mikroorganizmaların sayıca az olmasının ve bu nedenle plak sayım yöntemleriyle analiz edildiğinde saptanabilir seviyenin altında kalmasının bir sonucudur.

Zeytinin doğal mikrobiyolojik florası bakteri, maya ve küfler olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Zeytinin yüzeyinde bulunan mikroorganizmaların tipi ve oranı/karışımı iklim koşulları, zeytinin çeşidi ve zeytinin olgunluk aşaması ile etkilenmektedir. Zeytinde kendiliğinden oluşan fermentasyonu başlatan, doğal olarak bulunan mikroorganizmalardır. Nychas vd. (2002) mayaların zeytinin yüzeyinde ve stomal açıklığında

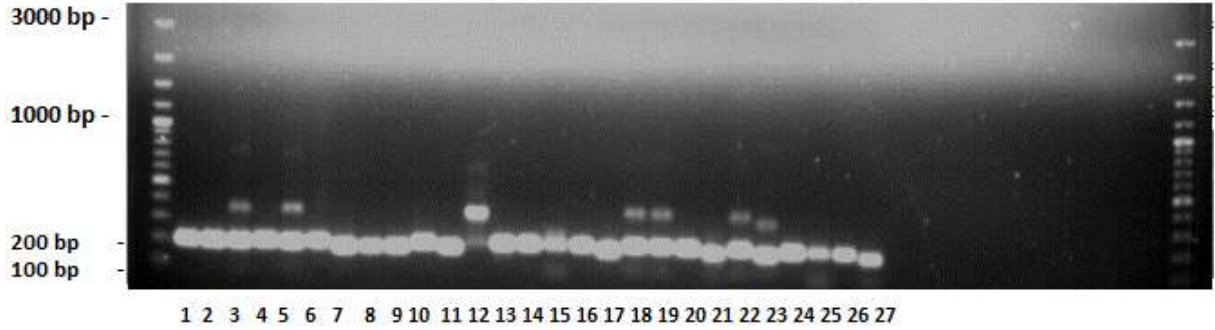
baskın olduğunu, bakterilerin ise sub-stomal hücrelerin hücrelerarası boşluklarında baskın olduğunu bildirmiştir. Taze zeytinlerde doğal olarak bulunan laktik asit bakterilerinin belirlendiği bir çalışmada *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus mesenteroides*, *Lactobacillus lactis* spp. *lactis* ve *Pseudomonas damnosus* türüne ait oldukları saptanmıştır (Korukluoğlu vd., 2002). Zeytin ağacından toplanan zeytin yaprağı ve zeytin salamurasından izole edilen 193 laktik asit bakterisi *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc* spp., *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmıştır (Lavermicocca vd., 1998). Aynı çalışmada bitki ve salamura arasında populasyon farklılıkları bulunmuştur. Araştırmacılar hemen hemen her izolatin oleuropein glukozitini degrade ettiğini ancak degradasyon hızının farklı olduğunu belirtmişlerdir.

Bununla birlikte, genellikle çevreden bulaşan diğer mikroorganizmalar bozulmaya ve gıda zehirlenmesine neden olma potansiyeline sahiptir (Kailis ve Harris, 2007). Çalışmamızda laktik asit bakterisi, Pseudomonads toplam canlı sayım plaklarından elde edilen izolatlardan da tanımlanamamıştır. *Staphylococcus* ve *Micrococcus* için kültürel sayım yapılan plaklardan herhangi bir izolasyon yapılamamakla birlikte toplam canlı ve *Enterobacteriaceae* sayım plaklarından bu gruplara ait bakteriler izole edilebilmiştir.

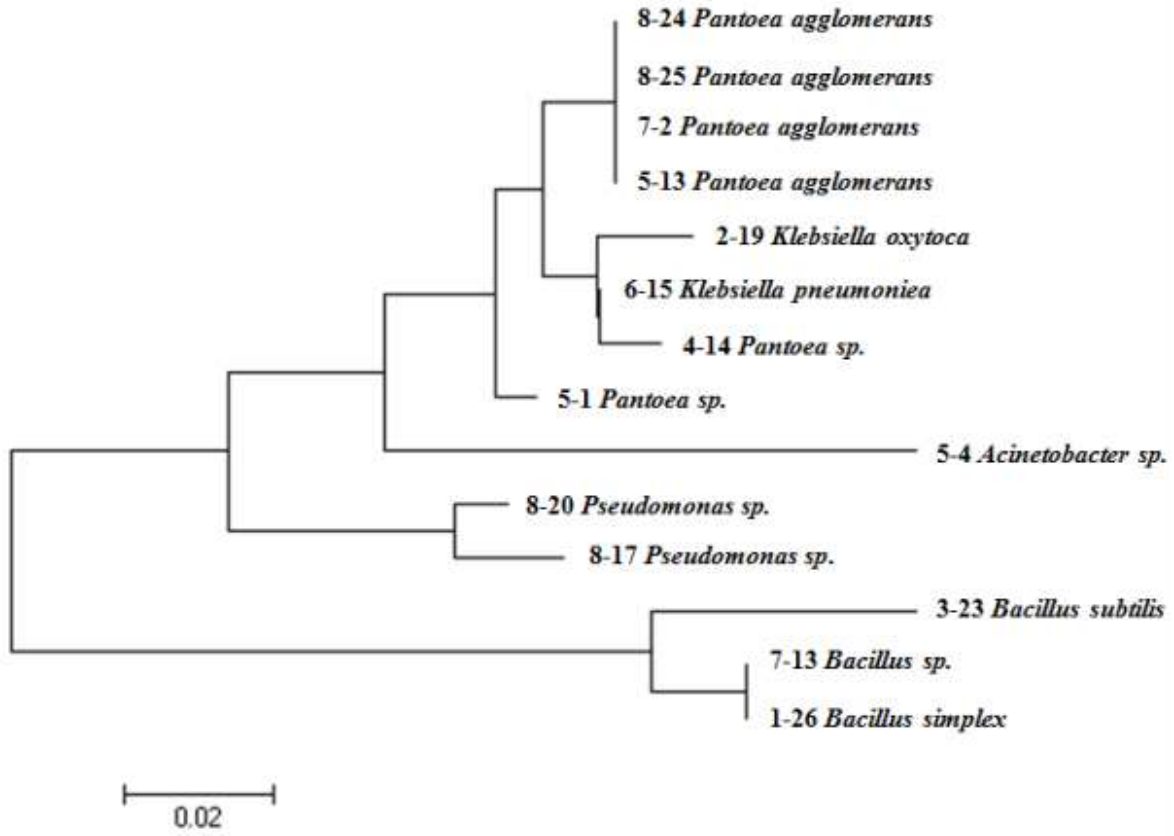
Zeytin meyvesi ve yaprakları AMM, Y&Ms, Enterobacteriaceae dan oluşan benzer bir mikrobiyal profile sahiptir. Her iki hasat yılında da Erkence zeytin bahçesi hava örneklerinde Enterobacteriaceae saptanmamıştır. Pseudomonadaceae, Staphylococci, Micrococcaceae ve LAB, Erkence zeytin phylloplane de saptanmamıştır. Bakteri izolatları Bacillaceae, Enterobacteriaceae ve Micrococcaceae olmak üzere 3 familyaya ait olan *Bacillus cereus*, *B.subtilis*, *B. megaterium*, *Enterobacter intermedius*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *M. varians*, *Staphylococcus* türleri olarak tanımlanmıştır (Şekil 25-26).

Birçok toprak çeşidi *Bacillus* türlerinin normal habitatıdır ve bu nedenle meyve ve sebzelerin yüzeyinde hasat edildikten sonra bulunmaktadır. Hastalık etmeni olan halk sağlığı açısından bir tehlike olarak görülmelidir. Hurma zeytin bahçeleri gibi meyve bahçeleri ve sebze tarlalarının ortamları aseptik veya steril değildir ve olması beklenemez. Ancak iyi tarım uygulamaları, hasat, işleme, taşıma, pazarlama ve hazırlama uygulamaları sırasında iyi üretim teknikleri ve HACCP uygulamaları kontaminasyon seviyesinin düşük olmasını sağlayabilmektedir. *Enterobacteriaceae* çevrede oldukça yaygındır ve bu nedenle bu familyadaki birçok mezofilik tür gıdaları düşük sayıda da olsa kontamine edebilmektedir. *Enterobacter* ve *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae* familyasına ait cinslerdir. *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca*, hayvan ve insan gut florasında yaşamaktadır fakat doğal çevrede de oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Bu nedenle bu mikroorganizmaların

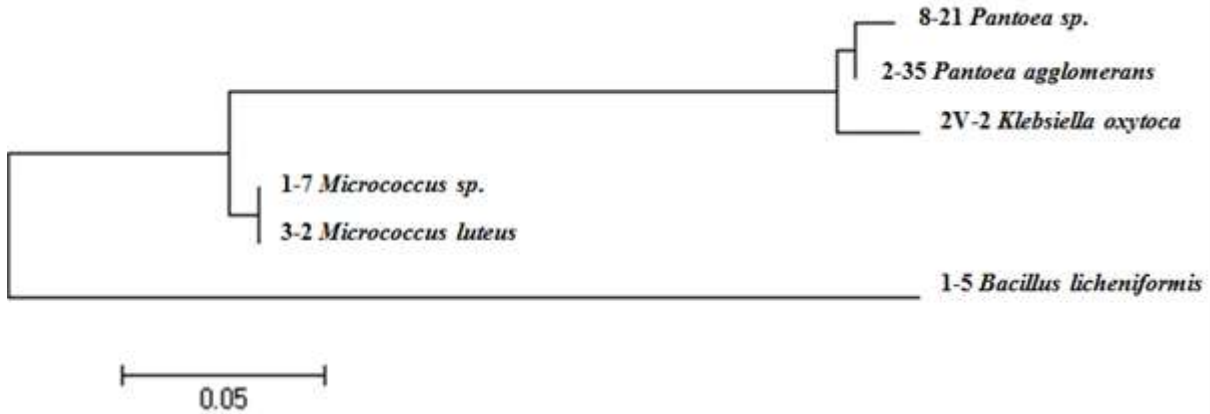
gıdalarda bulunması fekal bulaşmayı göstermemektedir. *Klebsiella* cinsine ait türler özellikle *K. pneumonia* ve *K. oxytoca*, fırsatçı (opportunistic) patojen bakterilerdir. Bununla birlikte, enfeksiyonun veya ürün kontaminasyonunun kaynaklarını tanımlamak ve patojenler veya bozulma etmeni organizmaların geçiş (transmission) yollarının anlaşılması için bakteriyel izolatların suş tiplemesi (strain typing) gerekmektedir.



Şekil 25. Bakteri izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Lane 1, molecular size marker 100 bp DNA ladder (Fermentas); lane 1, *Bacillus simplex*.; lane 2, *Bacillus simplex*; lane 4, *Klebsiella oxytoca*; lane 5, *Pantoea agglomerans* ; lane 6, *Klebsiella oxytoca*.; lane 9, *Micrococcus luteus*; lane 10, *Bacillus sp.*; lane 12, *Acinetobacter sp.*, lane 13, *Bacillus licheniformis*; lane 17, *Arthrobacter sp.* lane 21, *Arthrobacter sp.*; lane 22, *Pantoea sp.*; lane 23, *Streptomyces sp.*; lane 24, *Bacillus sp.*; lane 26, *Pseudomonas sp.*



(A)



(B)

Şekil 26. Hurma zeytin (A) ve Erkence zeytin (B) örneklerinden izole edilen bakterilerin % 2 (A) ve % 5 (B) farklılık gösteren 16S r DNA gen sekanslarına göre birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik (neighbor-joining) ağacı

4.2.3. Küf İzolatlarının Tanımlanması

İki hasat (2011-2012) yılında olgunlaşma sürecinde gerçekleştirilen analizler sonucunda Hurma ve Gemlik zeytinleri ve yapraklarından ve zeytinliklerde havadan alınan örneklerde sırasıyla toplam 498 ve 547 adet küf izole edilmiştir (Tablo 22). Küf izolatları 3

nokta ekim yöntemi kullanılarak saflaştırılmış (Şekil 27), makroskopik (koloni) ve mikroskopik (hücre) morfolojik özelliklerin sırasıyla stereomikroskopta ve ışık mikroskopunda belirlenmesi suretiyle tanımlama yapılmıştır (Şekil 28).

Moleküler yöntemle maya ve küflerin tanımlanması için 18S, 26S ve ITS1-ITS4 primerleri ile ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak ITS1-ITS4 primerleri ile tanımlamanın etkili bir şekilde yapılabildiği gözlenmiştir. Elde edilen PCR görüntüleri Şekil 29'da görülmektedir.

Mikroskopik ve makroskopik morfolojik özelliklere göre yapılan tanımlama sonucunda Gemlik ve Erkence zeytinleri, yaprakları ve hava örneklerinden izole edilen küfler *Aspergillus*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, Steril miselyum olarak tanımlanmıştır. Hurma zeytinden izole edilen küfler diğer zeytin ve yaprak örneklerinden izole edilenlerdekinden farklı olarak *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* gibi epifitik küfleri içermekle birlikte, *Botryosphaeria*, *Magnaporthe*, *Diplodia* gibi endofitik küfleri de içermektedir. *Cladosporium* ve *Epicoccum* yapraklardan izole edilmiştir (Tablo 23).

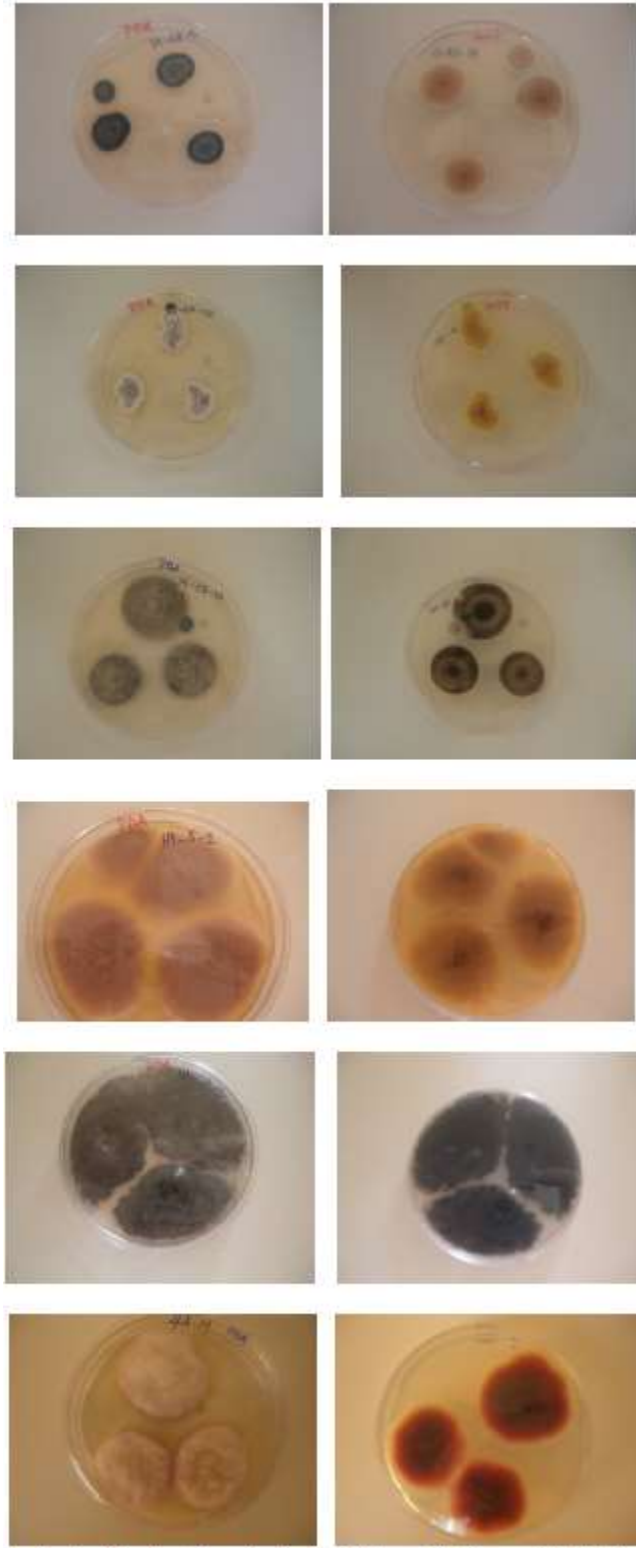
Dünyada en yaygın *Penicillia*, *Penicillium glabrum* Erkence ve Gemlik zeytinlerinden ve yapraklarından oldukça fazla izole edilmiştir. *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Aureobasidium* gibi koyu renkli mikrofunguslar daha çok Hurma ve Erkence zeytininden izole edilmiştir. Morfolojik olarak *Aspergillus niger* olarak tanımlanan bazı izolatların moleküler tanımlama sonucunda *Aspergillus japonicus* olduğu saptanmış ve bu sonuç siyah koloni rengine sahip *Aspergillus* Section Nigri içerisindeki 23 tür arasında yer alan *A. niger*, *A. Carbonarius* ve *A. japonicus*'un ancak moleküler yöntemle tam olarak ayrımının yapılabildiğini göstermiştir. Bazı küf izolatlarının kültür edilmesi mümkün olmamıştır. Bundan başka izole edilen ve morfolojik olarak tanımlanamayan bazı küflerin moleküler olarak da tanımlanması mümkün olmamıştır (Şekil 30-31).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar toksinojenik küflerin (*Aspergillus*) sporlarının zeytinde bulunduğunu ve bazı türlerin özellikle *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus ochraceus*'un zeytinde sırasıyla aflatoksin (AF) B1 ve okratoksin A (OTA) üretebilme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Leontopoulos vd., 2003).

Tablo 22. 2011 ve 2012 hasat yıllarına ait olgunlaşma sürecinde örnekleme analiz zamanına bağlı olarak Hurma ve Gemlik zeytinleri, yaprakları ve bahçelerindeki hava kaynaklı küf izolat sayıları

2011 Hasat Yılı Küf İzolat sayıları								
Örnekleme Zamanı (Hafta)	Hurma		Gemlik			Hava		Toplam
	Yaprak	Zeytin	Hurma	Yaprak	Zeytin	Eğlenhoca (Hurma)	İYTE (Gemlik)	
1	30	30	11	9	23	4	5	112
2	22	4	16	10	6	12	8	78
3	14	9	10	5	4	7	7	56
4	13	9	16	6	1	7	5	57
5	18	19	21	13	2	7	5	85
6	20	7	13	7	2	3	5	57
7	12	5	5	10	6	3	3	44
8	12	9	12	8	2	11	4	58
Toplam	141 (%25.77)	92 (%16.81)	104 (%19)	68 (%12.43)	46 (%8.40)	54 (%9.87)	42 (%7.67)	547

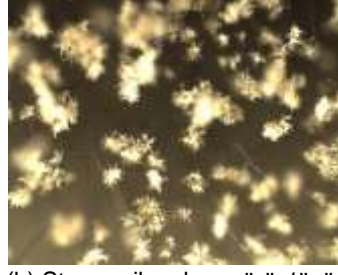
2012 Hasat Yılı Küf İzolat sayıları								
Örnekleme Zamanı (Hafta)	Hurma		Gemlik			Hava		Toplam
	Yaprak	Zeytin	Hurma	Yaprak	Zeytin	EğlenHoca (Hurma)	İYTE (Gemlik)	
1	30	30	11	9	23	4	5	112
2	22	4	16	10	6	12	8	78
3	14	9	10	5	4	7	7	56
4	13	9	16	6	1	7	5	57
5	18	19	21	13	2	7	5	85
6	20	7	13	7	2	3	5	57
7	12	5	5	10	6	3	3	44
8	12	9	12	8	2	11	4	58
Toplam	141 (%25.77)	92 (%16.81)	104 (%19)	68 (%12.43)	46 (%8.40)	54 (%9.87)	42 (%7.67)	547



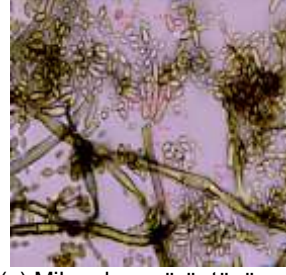
Şekil 27. Küf izolatlarının besiyerlerinde 3 nokta ekim koloni üst ve alt yüzey görüntüleri



(a) Stereomikroskop görüntüsü



(b) Stereomikroskop görüntüsü
H1-CZA-1



(c) Mikroskop görüntüsü



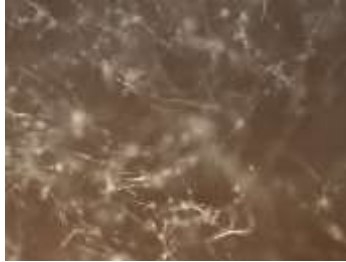
(a) Stereomikroskop görüntüsü



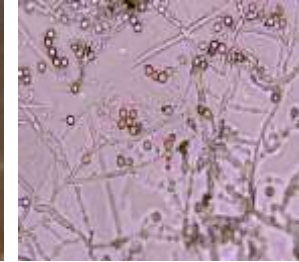
(b) Mikroskop görüntüsü
H1-CZA-3



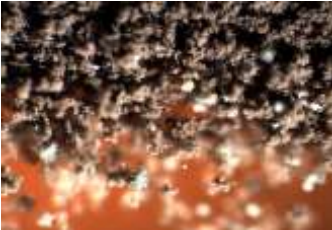
(a) Stereomikroskop görüntüsü



(b) Stereomikroskop görüntüsü
H1-OA-5



(c) Mikroskop görüntüsü



(a) Stereomikroskop görüntüsü



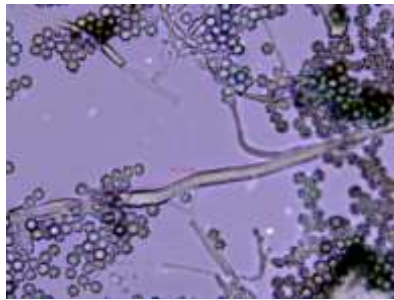
(b) Stereomikroskop görüntüsü
H1-PCA-2 (100x)



(c) Mikroskop görüntüsü



(a) Stereomikroskop görüntüsü



(b) Mikroskop görüntüsü
H1-PCA-3 ayak



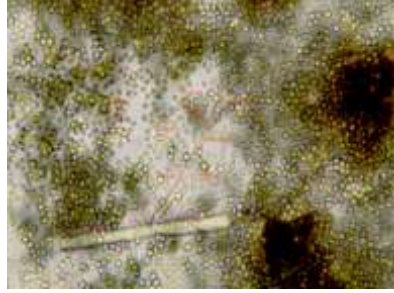
(a) Stereomikroskop görüntüsü



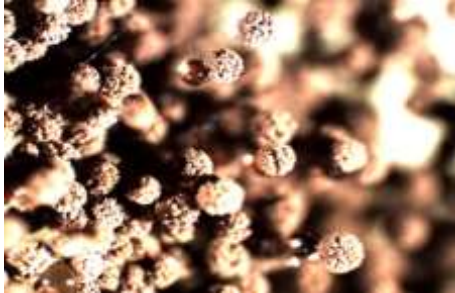
(b) Mikroskop görüntüsü
H1-PDA-4 (3)



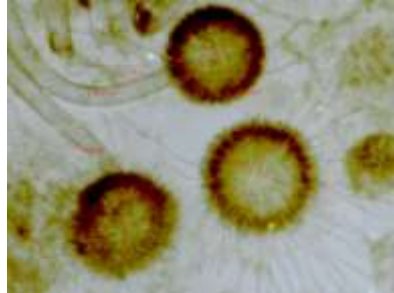
(a) Stereomikroskop görüntüsü



(b) Mikroskop görüntüsü
H1-PDA-5 ayak



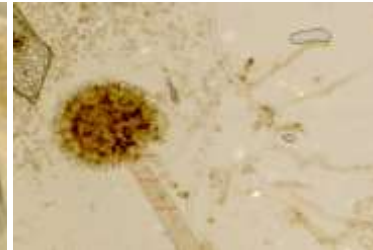
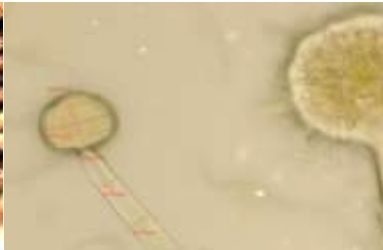
(a) Stereomikroskop görüntüsü



(b) Mikroskop görüntüsü
4Y-OA-20



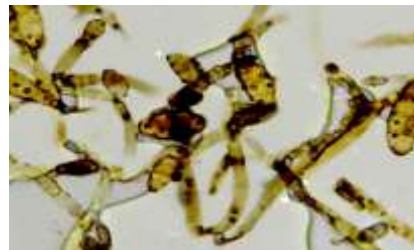
(a) Stereomikroskop görüntüsü



(b) Mikroskop görüntüsü CYA (40x) (c) Mikroskop görüntüsü PDA (40x)
6A-PDA-5



(a) Stereomikroskop görüntüsü



(b) Mikroskop görüntüsü
8H-PDA-5



(a) Stereomikroskop görüntüsü

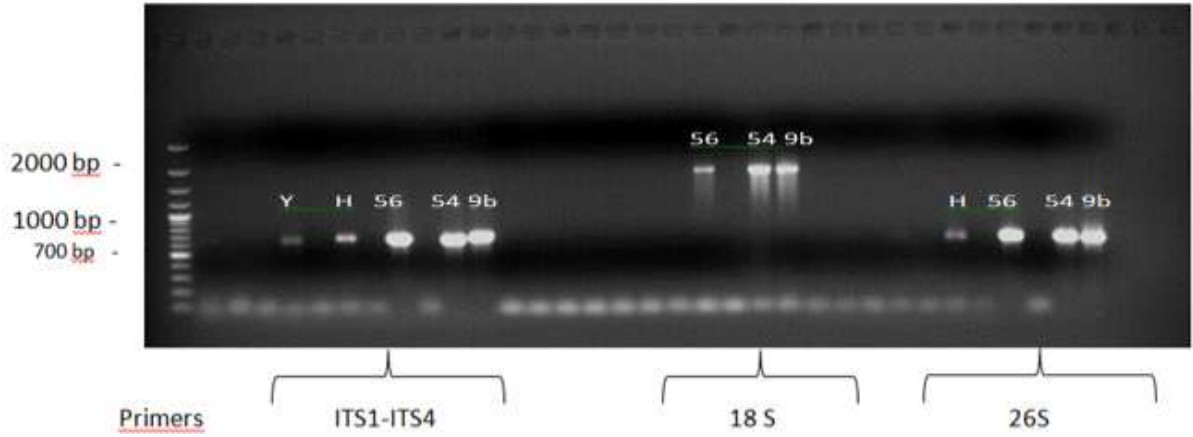


(b) Mikroskop görüntüsü
H1-OA-2



(a) Mikroskop görüntüsü
8H-CZA-35

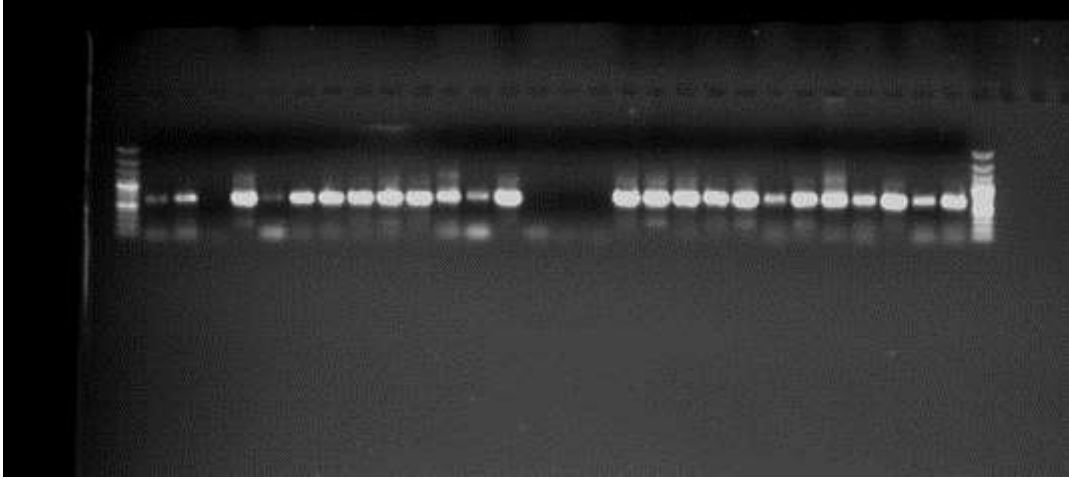
Şekil 28. Küf izolatlarının mikroskobik (hücre) morfolojik özelliklerinin sırasıyla stereomikroskopta ve ışık mikroskobunda inceleme sonuçları



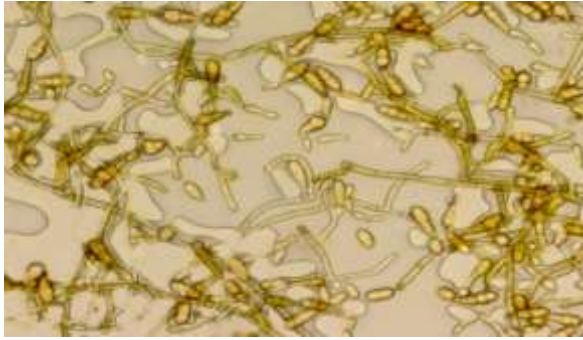
Şekil 29. Farklı primerlerler (ITS, 18S, 26S) kullanıldığında izolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri. Y, yaprak örneği (direkt örnek), H, Hurma zeytin (direkt örnek), 56, maya izolatı, 54: maya izolatı, 9b: maya izolatı

Tablo 23. Moleküler tekniklerle tanımlanan 2011 ve 2012 hasat yıllarında olgunlaşma periyodu süresince Hurma zeytininden izole edilen fungal cins ve türler

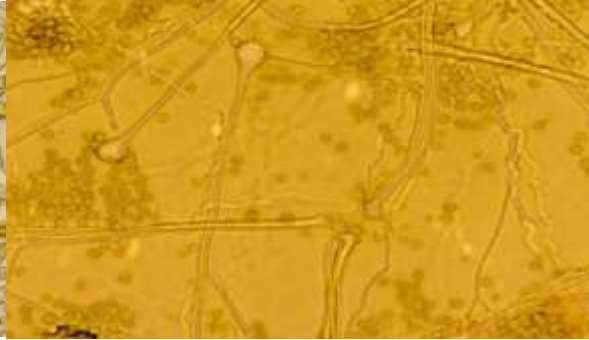
Fungal Cins ve Türler	
<i>Aspergillus</i>	<i>Emericella</i> sp.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Emericella varicolor</i>
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Emericella gingixianii</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium sp</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Fusarium fujikuroi</i>
<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Paecilomyces</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Paecilomyces spp.</i>
<i>Aspergillus ustus</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Alternaria spp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>
<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Uncultured Alternaria clone</i>	<i>Penicillium glabrum</i>
<i>Botryosphaeria</i>	<i>Penicillium paxilli</i>
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Colletotrichum</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	
<i>Diplodia</i>	
<i>Diplodia pinea</i>	
<i>Diplodia scrobiculata</i>	



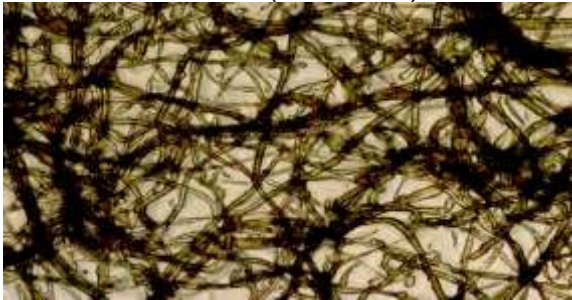
Şekil 30. Kf izolatlarının PCR rnlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Lane 1 (Z1-SDA-2) *Aspergillus sydowii*; lane 2 (Z1-OA-10) *Penicillium paxilli*; lane 3 (2H3-PDA-30) Not identified; lane 4 (5H2-PDA-12) *Aspergillus fumigatus*; lane 5 (6H-PDA-37) *Uncultured Alternaria clone*; lane 6 (6H-PDA-2) *Fusarium fujikuroi*; lane 7 (6H1-CZA-4) *Fusarium sp.*; lane 8 (6H-PDA-43) *Aspergillus oryzae*; lane 9 (6H-PDA-41) *Penicillium sp.*; lane 10 (7H-OA-71) *Penicillium glabrum*; lane 11 (8H-PDA-7) *Penicillium sp.*; lane 12 (8H-SDA-12) *Paecilomyces variotii*; lane 13 (2.5H-SDA-13) *Penicillium glabrum*; lane 14 (2.5H-SDA-4) Not identified; lane 15 (2.5H-SDA-6) Not identified; lane 16 (2.7H-PDA-84) Not identified; lane 17 (3H-CZA-5) *Aspergillus japonicus*; lane 18 (8H-CZA-13) *Aspergillus ochraceus*; lane 19 (2.3H-PDA-19) *Aspergillus oryzae*; lane 20 (H1-PCA-2) *Aspergillus sydowii*; lane 21 (4H-OA-6) *Penicillium funiculosum*; lane 22 (8H2-PDA-24) *Penicillium expansum*; lane 23 (8H2-OA-21) *Aspergillus fumigatus*; lane 24 (H1-OA-4) *Diplodia pinea*; lane 25 (H1-PDA-7) *Penicillium sp.*; lane 26 (2.5H1-SDA-16) *Penicillium glabrum*; lane 27 (H1S2) *Aspergillus terreus*; lane 28 (8H5-SDA-11) *Aspergillus fumigatus*; lane 29 (H1-S2) *Aspergillus terreus*; lane 30 (Z1-OA-1) *Penicillium sp.*; lane 31 (H1-OA-5) *Magnaporthe grisea isolate*; lane 32 (H1-PCA-5) Not identified; lane 33 (H1-PDA-4) *Penicillium sp.*; lane 34 (2.1A-PDA-7) *Aspergillus terreus*; lane 35 (3A-PDA-4C) *Aspergillus fumigatus*; lane 36 (3A-PDA-1) *Penicillium sp.*; lane 37 (4A-PDA-7) *Aspergillus ustus*; lane 38 (4H3-PDA-31) Not identified; lane 39 (4H-PDA-1) *Alternaria tenuissima*; lane 40 (4A-PDA-11) *Emericella sp.*; lane 41 (4A-PDA-6) Not identified; lane 42 (4H3-SB-35) *Penicillium sp.*



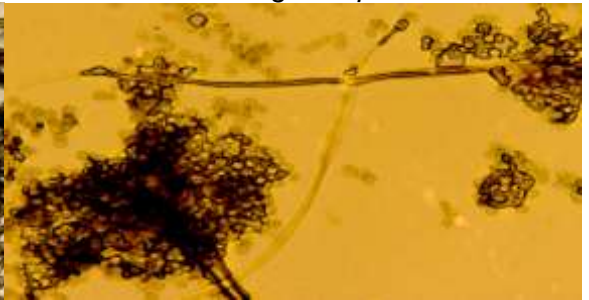
Alternaria tenuissima (4H-PDA-1)



Colletotrichum gloeosporioides H1-OA-5



Botryosphaeria dothidea H1-OA-4



Emericella sp. 4A-PDA-11

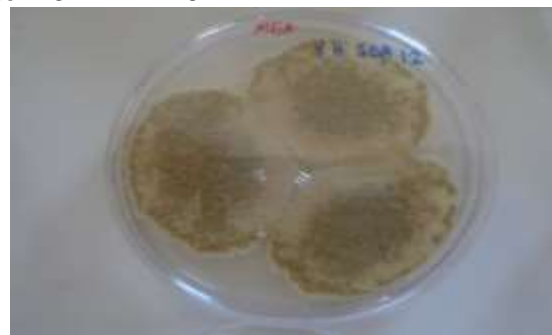


Czapeck Agar



Malt Extract Agar

Aspergillus oryzae 2.3H-PDA-19



(8H-SDA-12) *Paecilomyces variotii*



(6H-PDA-2) *Fusarium fujikuroi*



CZPA Koloni Üst Görünüşü

CZPA Koloni Alt Görünüşü

(8H-PDA-7) *Penicillium sp*

Şekil 31. Tanımlamada kullanılan besiyerlerinde 3 nokta ekim yapılmış küflerin koloni üst ve alt görünüşleri

4.2.4. *Phoma* Suşlarının Moleküler Yöntemle Tanımlanması

Asıl olarak Yunanistan (Girit, Ege adaları ve Attica bölgesi)'da yetişen Throuba tipi (Thrubolea) zeytinin, bir fungal enzim tarafından acılığının giderildiği ve değişime uğradığı düşünülmektedir. Zeytinler siyahtan bakır yeşiline rengini değiştirmekte ve daha sonra güneşte kurutularak tuzlanmaktadır. Ancak, bu zeytin tipinde acılığın giderilmesinde bir fungusun rolü olduğunu destekleyen çok az bir bilgi mevcuttur (Kailis ve Harris, 2007). Hurma zeytine benzer şekilde kuru tuzlama yapılan bir zeytin tipi olan “naturally black olives-throuba style” asıl olarak Girit’de yerleşik olarak bulunmaktadır. Tamamen olgun olduğu zaman zeytinin yüzeysel rengi kahverengi olmakta ve zeytin herhangi bir uygulama yapılmaksızın doğrudan ağaçta acılığını kaybetmektedir. Daha önceki bir çalışmaya göre zeytindeki acılığın zeytin etinde gelişen ve oleuropeini hidrolize eden *Phoma oleae* adlı mantarın bulunmasına dayandığı ifade edilmiştir (Kalogereas, 1932). Oleuropeinin enzimatik hidrolizinin özellikle bakteriler ve fungusların her ikisinin de ürettiği beta (β)-glukozidaz enzimi ile gerçekleştiği literatürde çok açık bir şekilde ortaya koyulmuştur (Copa-Patino vd., 1990; Know vd., 1992; Ciafardini vd., 1994; Ciafardini ve Zullo, 2000).

Phoma spp. (Sphaeropsidales) çok farklılaşmış, biyolojik olarak özelleşmiş bir fungus grubunu oluşturmaktadır (Marcinkowska, 1995). Bu grup farklı substratlarda gelişen, parazit karakterindeki bitkilerin ikincil patojenlerinin ve yetiştirilen bitkilerin özellikli patojenlerinin yer aldığı sporofit türleri içine almaktadır. Anamorphic *Phoma* cinsi 220'den fazla özellikli ve intraspesifik taxa içermektedir (Boerema vd., 2004).

Phoma cinsi içerisindeki bilinen *Phoma* türlerinin *in vitro* doğrulanmış literatürde tanımlanan binlerce türün sadece bir kısmı olan taxanın gerçek sayısının muhtemelen çok daha fazla olabileceği belirtilmiştir (Aveskamp vd., 2008). *Phoma* cinsine ait fungusların izole edildiği bitki grubu otsu/yeşil yaprağa benzer olarak adlandırılan "herbaceous" bitkileri kapsamaktadır (Machowicz-Stefaniak vd., 2002 ve 2004).

Phoma bir çalışmada genç zeytin ağaçlarından izole edilmiştir (Sanchez Hernandez, 1995). Küçük sporlara sahip bazı *Alternaria* türlerinin normal koşullarda ürettiği biyolojik olarak etkin toksik bir bileşik olan tenuazonic asiti *Phoma sorghina*'nın ürettiği bildirilmiştir (Shephard vd., 1991; Andersen vd., 2002). *Brassica* cinsine ait bitkilerde "blackleg" hastalığının etmeni, *Phoma lingam* (sexual stage *Leptosphaeria maculans*)'ın bazı biyolojik olarak etkin bileşikleri ürettiği bildirilmiştir (Pedras ve Chumala, 2005). Çok iyi tanımlanmış *Phoma* suşları tarafından metabolit üretimi üzerine sınırlı sayıda rapor olmasına karşılık *Phoma* türlerinin gıdalarda ve yemlerde bulunması, biyolojik olarak etkin ikincil metabolitlerin olası üretimi nedeniyle merak ve ilgi konusu olmaktadır. Bu nedenle Karaburun çevresindeki zeytin çeşidinde hurmalaşmaya sebep olan mantarın ya da mikroorganizmanın ne olduğu, ayrıca bunların dışında yöreye has *Phoma oleae* isimli bir mantar türü olup olmadığı bilimsel çalışmalarla ortaya konulması gereken bir konu halini almaktadır.

Uluslararası makale ve kitaplarda hurmalaşmaya etken olan *Phoma oleae* isimli mantar hakkında taksonomik ve tarımsal alanlarda herhangi bir kayıta rastlanmamıştır. *Phoma* grubu içerisinde 2 alt türü (*Phoma fallens*, *Phoma insulana*) zeytin bitkisi ve meyvesi üzerinde enfeksiyona neden olmaktadır. *Phoma fallens*, yapraklarda ve meyvede lekeler şeklinde semptomlar göstermektedir. *Phoma insulana* ise, Kuzey yarım kürede ve Güney Avrupa'da görülen ve meyvelerde renk değişimi ve olgunlaşmaya neden olan bir mantardır (Boerema vd., 2004).

Phoma türlerinin örneklerde direkt moleküler tanımlanmasında kullanılan primerlerin özellikleri Tablo 24'de verilmiştir.

Tablo 24. *Phoma* türlerinin tanımlanmasında kullanılan primerler

Gen	Primer	Primer sekansı 5'-3'	Ürün uzunluğu	Kaynak
Actin	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	200-250 bp	Carbone & Kohn 1999
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT		Carbone & Kohn 1999
ITS	V9G	TTAAGTCCCTGCCCTTTGTA	450-550 bp	De Hoog & Gerrits van den Ende 1998
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		White et al. 1990

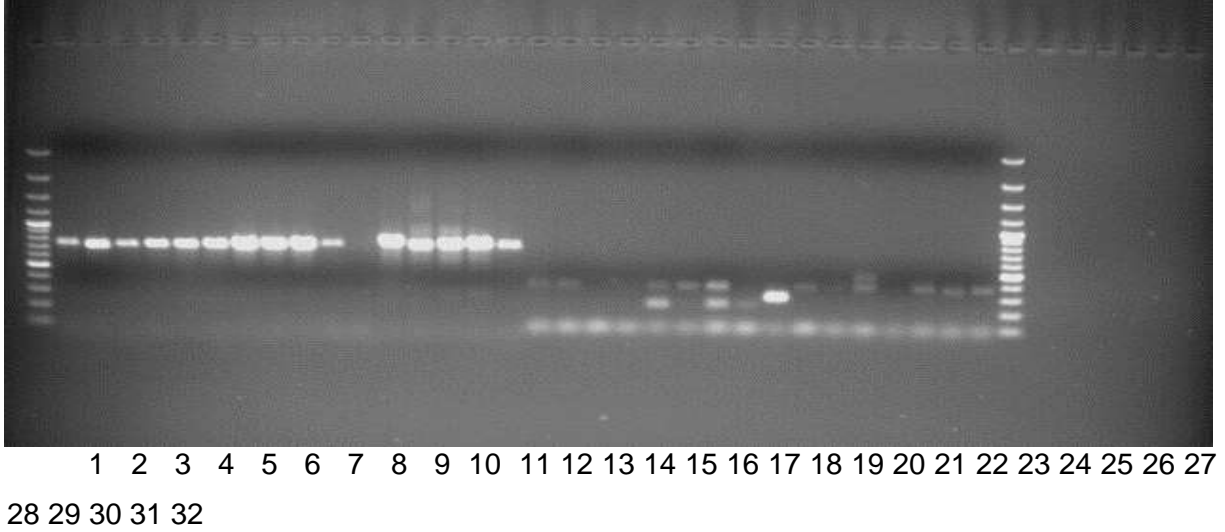
Bu metotla yapılan tanımlamada kullanılan yöntem materyal metot bölümünde verilmiştir. Bu yöntemdeki PCR koşulları Aveskamp vd. (2009a) (ACT, TUB, ITS), Aveskamp vd. (2009b) (ACT), De Gruyter vd. (2009) (LSU, SSU) ve Woudenberg vd. (2009) (ITS, TUB) tarafından gerçekleştirilen çalışmalardakine göre belirlenmiştir.

Literatürde Hurma zeytin oluşumuna neden olan mikroorganizmanın *Phoma oleae* isimli bir mantar olduğu belirtilmekle birlikte bu mikroorganizma ile ilgili hakkında taksonomik ve tarımsal alanlarda herhangi bir kayıta rastlanmamıştır (Kalogereas, 1932; Buzcu, 1969; Boerema vd., 2004). Ancak bu konuda daha önce yapılan çalışmalarda araştırmada kullanılan yöntemler ve teknikler göz önüne alındığında çok sınırlı, daha az hassas ve güvenilir sonuçlar alınabileceği açıktır.

Çalışmada 18S ve 28S rRNA arasındaki genlerde yer alan, arada kalan ITS1 ve ITS2 olmak üzere 2 bölgeyi ve oldukça korunmuş 5.8S rRNA genini kapsayan rRNA operonun internal transcribed spacer (ITS) bölgesi seçilmiştir (White vd., 1990). Bu hedefin seçilmesinin başlıca nedenleri rRNA operonun fungal genomda birden fazla kopya şeklinde bulunması (Rooney ve Ward, 2005), ITS bölgesine dayanan tanımlama işlemlerinin belirlenmiş olması (Iwen vd., 2002), çok yakın türlerin daha iyi bir ayırımına izin veren ITS bölgesindeki sekans değişkenliğinin bitişik rRNA kodlayan bölgelerden daha fazla olması (Hinrikson vd., 2005) ve ITS sekanslarının oldukça fazla sayıda genel veritabanında mevcut olmasıdır.

Yaptığımız bu çalışmada moleküler tekniklerle (PCR-Sekanslama) küf tanımlamaları amacıyla ITS geninin oldukça iyi sonuç verdiği gözlenmekle birlikte özellikle *Phoma* türlerinin tanımlanmasında veya *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin tanımlanmasında ACT veya TUB genlerinin ilaveten sekanslanmasının tam bir tanımlamaya ulaşabilmek için gerekli olduğu gözlenmiştir (Tablo 25 -26).

Hurma zeytinden *Phoma* türlerine spesifik ITS ve ACT genlerinin kullanılması suretiyle gerçekleştirilen direkt *Phoma* türlerinin tanımlanmasının sonucunda Hurma zeytinin olgunlaşma süreci boyunca ilk haftadan başlamak üzere bulunduğunu göstermiştir (Tablo 25-26, Şekil 32).



Şekil 32. Lane 1-16 ITS/VG9 Lane 17-32 ACTIN primerleri kullanılmıştır. Kodlar: 1 H1, 2 H2, 3 H3, 4 H4, 5 H5, 6 H6, 7 H7, 8 H8, 9 2H1, 10 2H2, 11 2H3, 12 2H4, 13 2H5, 14 2H6, 15 2H7, 16 2H8, 17 H1, 18 H2, 19 H3, 20 H4, 21 H5, 22 H6, 23 H7, 24 H8, 25 2H1, 26 2H2, 27 2H3, 28 2H4, 29 2H5, 30 2H6, 31 2H7, 32 2H8. Lane 1 (2H1) *Botryosphaeria dothidea*; lane 2 (2H2) *No identification*; lane 3 (2H6) *Hypoxyylon vinosopulvinatum*; lane 4 (2H7) *Penicillium chrysogenum*; lane 5 (2H8) *Colletotrichum gloeosporioides*; lane 6 (H1) *Emericella gingixianii*; lane 7 (H2) *Emericella varicolor*; lane 8 (H6) *Hypoxyylon erythrostroma*; lane 9 (2H1) *Penicillium sp.*; lane 10 (2H2) *Aspergillus japonicus*; lane 11 (2H6) *Penicillium sp.*; lane 12 (2H7) *Penicillium chrysogenum*; lane 13 (2H8) *Aspergillus varicolor*, *Emericella nidulans*; lane 14 (H1) *Aerobasidium proteae*, *Kabatiella microsticta*; lane 15 (H2) *Fusarium fujikuroi*, *Gibberella moniliformis*; lane 16 (H6) *Kabatiella microsticta*, *Aerobasidium proteae*

Tablo 25. Hurma zeytinden *Phoma* türlerine spesifik ITS ve ACT genlerinin kullanılması suretiyle metot 1'e göre gerçekleştirilen tanımlama sonuçları

	Hurma Örnek Kodu	Phoma Spesifik Primerle Moleküler Tanımlanan Türler	Accession number	Query cover %	ID %
1	2H1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	AY972117.1	68	95
		<i>Botryosphaeria ribis</i>	DQ267605.1	64	79
		<i>Dothiorella sp.</i>	Ef107755.1	38	90
2	2H3	<i>Aspergillus niger</i>	AM270331.1	97	90
3	2H4	<i>Aspergillus niger</i>	AY951872.1	44	82
		<i>Nemania diffusa</i>	GQ389692.1	19	100
		<i>Biscoqniauxia citrifomis</i>	AY951790.1	11	94
4	2H5	<i>Hormonema carpetanum</i>	AY616227.1	33	86
		<i>Kabatina juniperi</i>	AY616215.1	30	86
		<i>Sydowia polyspora</i>	AY616214.1	30	84
		<i>Diplodia seriata</i>	EU220455.1	25	84
5	H4	<i>Hormonema carpetanum</i>	AY616227.1	79	81
		<i>Phoma clematidina</i>	FJ426882.1	72	80
		<i>Sydowia polyspora</i>	AY616214.1	79	78
		<i>Phoma sorghina</i>	FJ426954.1	73	78
		<i>Phoma narcissi</i>	FJ426931.1	82	76
6	H5	<i>Hormonema carpetanum</i>	AY616227.1	75	80
		<i>Phoma clematidina</i>	FJ426882.1	68	81
		<i>Sydowia polyspora</i>	AY616214.1	75	78
		<i>Cladosporium perangustum</i>	HM148631.1	66	79
7	H7	<i>Hypoxyton erythrostroma</i>	AY951827.1	40	78
		<i>Emericella gingixianii</i>	AB476787.1	42	77
		<i>Epicoccum nigrum</i>	FJ426891.1	43	77
		<i>Phaeoacremonium krajdinii</i>	AY579266.1	40	78
8	H8	<i>Hormonema carpetanum</i>	AY616227.1	73	80
		<i>Phoma clematidina</i>	FJ426882.1	65	80
		<i>Phoma sorghina</i>	FJ426954.1	66	79
		<i>Kabatina juniperi</i>	AY616215.1	73	77
9	H1-OA-4	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	AY972117.1	97	99
		<i>Botryosphaeria berengiana</i>	JF501229.1	87	98
		<i>Diplodia scrobiculata</i>	AY253292.1	97	80
10	H1-OA-5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ846677.1	98	99
		<i>Pseudocercospora rhoina</i>	GU320474.1	99	80
		<i>Emericella foeniculicola</i>	AB476775.1	49	97

Tablo 26. Hurma zeytinden *Phoma* türlerine spesifik ITS ve ACT genlerinin kullanılması suretiyle metot 2'ye göre gerçekleştirilen tanımlama sonuçları

	code	species	Accession number	ID %
1	2H1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	AY972117.1	99
2	2H2	<i>No identification</i>		
3	2H6	<i>Hypoxylon vinosopulvinatum</i>	AY951872.1	86
4	2H7	<i>Penicillium chrysogenum</i>	AM920435.1	76
5	2H8	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ846677.1	87
		<i>Aspergillus sp.</i>	DQ094853.1	85
6	H1	<i>Emericella gingixianii</i>	AB476787.1	76
7	H2	<i>Emericella varicolor</i>	A76794.1	71
		<i>Emericella gingixianii</i>	AB476787.1	71
8	H6	<i>Hypoxylon erythrostroma</i>	AY9518827.1	78
		<i>Emericella gingixianii</i>	AB476787.1	77
9	2H1	<i>Penicillium sp</i>	KF367504.1	99
10	2H2	<i>Aspergillus japonicus</i>	KC128815.1	95
11	2H6	<i>Penicillium sp.</i>	KF367536.1	91
12	2H7	<i>Penicillium sp.</i>	AM901692.1	96
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	HQ882177.1	96
13	2H8	<i>Aspergillus varicolor</i>	HQ674656.1	97
		<i>Emericella nidulans</i>	HQ674655.1	97
14	H1	<i>Aerobasidium proteae</i>	JN712492.1	96
		<i>Kabatiella microsticta</i>	EU167608.1	96
15	H2	<i>Fusarium fujikuroi</i>	HF679024.1	98
		<i>Gibberella moniliformis</i>	EU364864.1	98
16	H6	<i>Kabatiella microsticta</i>	EU167608.1	98
		<i>Aerobasidium proteae</i>	JN712492.1	98

4.2.5. Maya İzolatlarının Tanımlanması

İlk hasat yılındaki (2011) olgunlaşma sürecinde gerçekleştirilen analizler sonucunda örneklerden toplam 48 maya izole edilirken ikinci hasat yılında 146 izole edilmiştir (Tablo 27). Zeytin örneklerinden izole edilen mayalar (30 et) *Candida guilliermondii*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporan asahii*, *Stephanoascus ciferri* olmak üzere çoğunlukla *Candida* (25) cinsine aittir (Şekil 33).

Tablo 27. 2011 ve 2012 hasat yıllarına ait olgunlaşma sürecinde örnekleme analiz zamanına bağlı olarak Hurma ve Gemlik zeytinleri, yaprakları ve bahçelerindeki hava kaynaklı maya izolat sayıları

2012 Hasat Yılı Maya İzolat sayıları								
Örnekleme Zamanı (Hafta)	Hurma		Gemlik		Hava		Toplam	
	Yaprak	Zeytin	Hurma	Yaprak	Zeytin	Eğlenhoca (Hurma)	İYTE (Gemlik)	
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	8	-	-	-	-	8
3	-	-	1	-	-	-	-	1
4	3	-	19	2	3	-	-	27
5	2	-	1	1	-	-	-	4
6	1	-	-	-	-	-	-	1
7	3	-	-	-	4	-	-	7
8	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	9 (%18.8)	-	29 (%60.4)	3 (%6.3)	7 (%14.6)	-	-	48

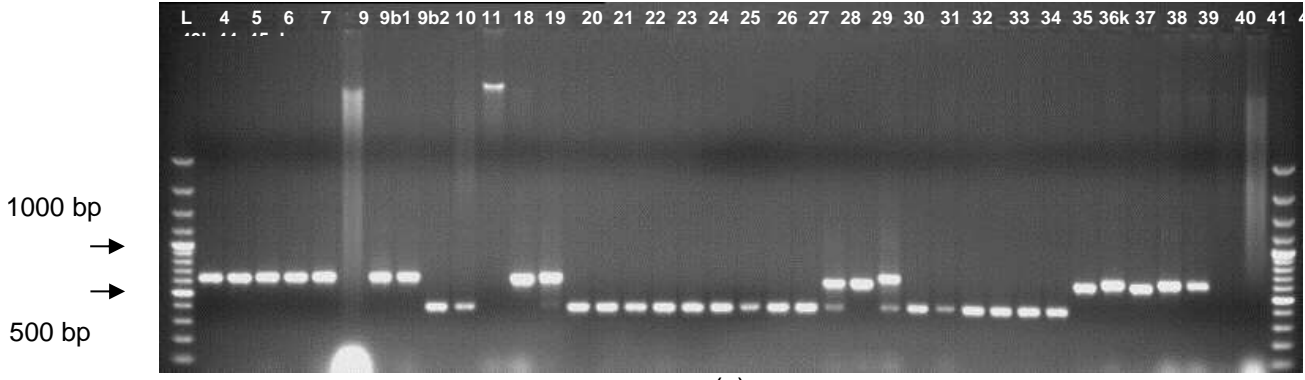
2012 Hasat Yılı Maya İzolat sayıları								
Örnekleme Zamanı (Hafta)	Hurma		Gemlik		Hava		Toplam	
	Yaprak	Zeytin	Hurma	Yaprak	Zeytin	EğlenHoca (Hurma)	İYTE (Gemlik)	
1	3	-	-	-	1	1	-	5
2	10	-	-	2	-	1	-	13
3	1	-	-	2	-	-	-	3
4	9	-	-	3	1	-	-	13
5	11	-	5	6	11	2	-	35
6	11	1	11	11	5	2	-	41
7	10	-	8	10	1	-	-	29
8	1	-	2	4	-	-	-	7
Toplam	57 (%39)	1 (%0.7)	26 (%17.8)	38 (%26)	19 (%13)	6 (%4)	-	146

Hurma ve Gemlik yaprak örneklerinden izole edilen mayalar benzerlik göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre Hurma yaprak örneklerinden izole edilen mayalar, Hurma

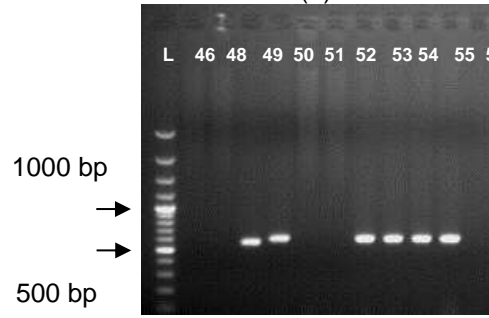
zeytinden izole edilen mayalarla benzerlik gösteren türlere sahip olmakla birlikte *Candida* türlerini içermemesi açısından farklıdır. Hurma zeytin örneklerinden izole edilen maya türleri çeşitlilik göstermektedir ve Gemlik zeytininden izole edilen mayalardan farklıdır. Mayaların tanımlanmasında kullanılan morfolojik, biyokimyasal ve moleküler testlerin sonuçları Tablo 28 ve 29'da verilmiştir.

Son yıllarda mayaların tanımlanmasında moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Maya türlerinin tanımlanmasında kullanılan en geçerli moleküler yöntemler 5.8S, 18S ve 26S ribozomal genlerin çeşitliliğine dayanmaktadır (Kurtzman, 1992; Cai vd., 1996; James vd., 1996). Daha önceki çalışmaların sonuçları karmaşık ITS bölgelerinin (non-coding ve değişken) ve 5.8S rRNA geni (coding and korunmuş), 18S ve 26S rRNA genlerinden daha fazla interspesifik farklılıklar göstermekten çok uzak olduğu için, yakın fungal filogenetik ilişkileri ölçmede faydalı olduğunu göstermiştir (Kurtzman, 1992; Cai vd., 1996; James vd., 1996). www.yeastid.com (Valencia University and CSIC, Spain) da maya türlerinin büyük bir çoğunluğu için 5.8S rRNA-ITSs'den amplifiye edilmiş CfoI, HaeIII, HinfI and ScrFI endonükleazlarla üretilen restriksiyon patternleri mevcuttur (Esteve-Zarzoso vd., 1999).

Bilgimiz dâhilinde zeytinden izole edilen mayaların tanımlanmasında moleküler yöntemlerin kullanıldığı çok az çalışma bulunmaktadır (Arroyo-Lopez vd., 2006). Günümüze kadar Hurma zeytinin oluşumu sürecinde mikroorganizmaların tanımlanmasında moleküler yöntemlerin kullanıldığı herhangi bir çalışma mevcut değildir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma sonucunda 2011 ve 2012 yıllarında olgunlaşma periyodu süresince izole edilen mayaların hasat yılları açısından az da olsa farklılık göstermekle birlikte, genellikle benzer maya türlerine sahip olduğu gözlenmiştir. Örneklerden izole edilen mayalar moleküler yöntemle 2011 yılında çoğunlukla *Candida diddensiae*; *Debaryomyces hansenii*; *Metschnikowia viticola*; *Candida zeylanoides*; *Aureobasidium pullulans*; *Metschnikowia pulcherrima*; *Rhodotorula mucilaginosa* olarak tanımlanırken 2012 yılında ise *Aureobasidium pullulans*; *Fungal sp.*; *Cryptococcus albidus*; *Rhodotorula mucilaginosa*; *Cryptococcus aerius*; *Sporidiobolus pararoseus*; *Candida pimensis*; *Mortierella indohii*; *Sporidiobolus salmonicolor*; *Cryptococcus magnus*; *Metschnikowia sp.*; *Pseudozyma hubeiensis*; *Metschnikowia pulcherrima* olarak tanımlanmıştır (Şekil 33-34). 2012 hasat yılına ait maya türlerinin önceki yıla göre daha fazla çeşitlilik gösterdiği belirtilebilir.

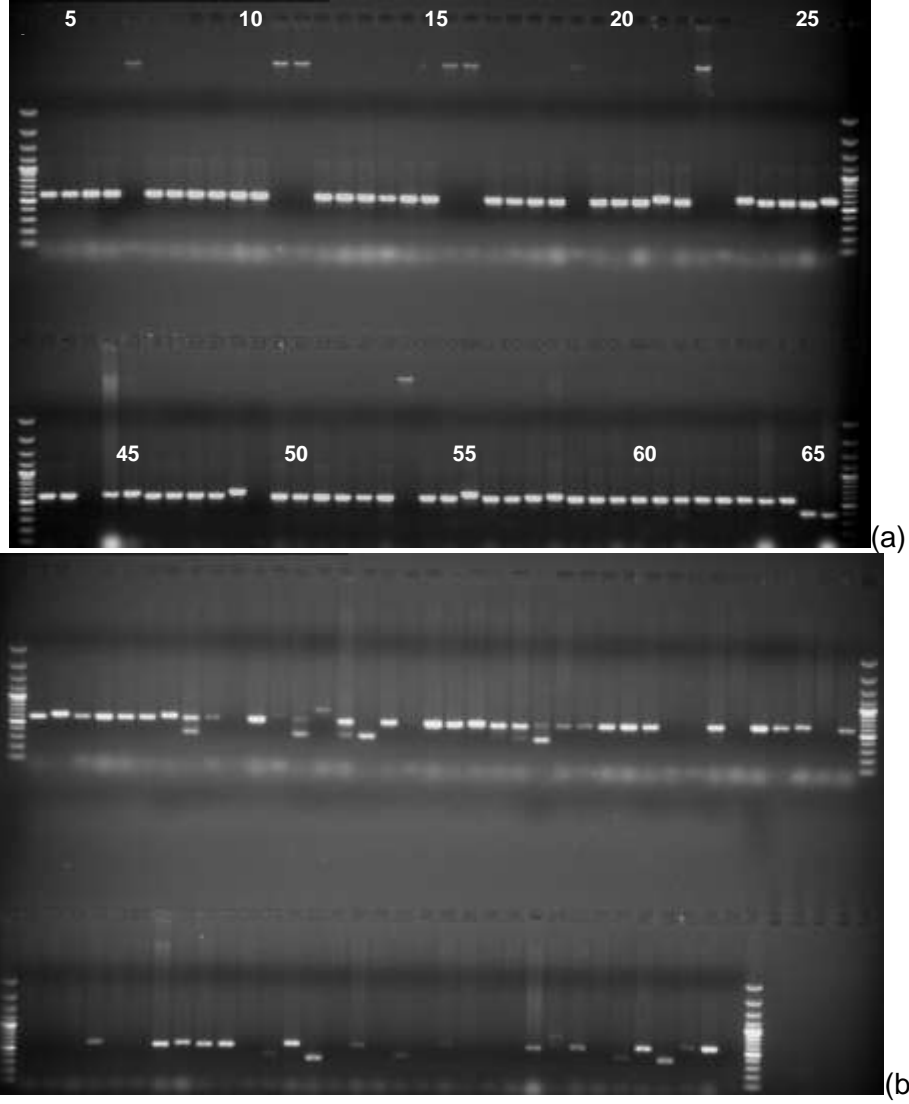


(a)



(b)

Şekil 33 a ve b. 2011 yılı zeytin maya izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Lane 4-5: *Candida diddensiae*; Lane 6-7, 9, 9b2, 10, 21: *Debaryomyces hansenii*; Lane 11, 18, 22-30; 34-35, 36k, 37-39: *Metschnikowia viticola*; Lane 20: *Candida zeylanoides*; Lane 31-32, 40, 42, 49: *Aureobasidium pullulans*; Lane 33: *Metschnikowia pulcherrima*; Lane 41, 43a, 43k, 50, 53-56: *Rhodotorula mucilaginosa*; Lane 9b1, 19, 44-46, 48, 51-52: unidentified; GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. N: negatif kontrol



Şekil 34 a ve 1b. 2012 yılı zeytin maya izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Lane 1-4, 6-11, 14-19, 22-25, 27-29, 31, 35-37, 39-40, 44-47, 50-55, 57-58, 60-61, 64-74, 77, 79-82; 84-85, 87, 91, 93, 95-99, 101-105, 108, 110-111, 114, 118, 121-124, 127, 130, 134, 138, 140, 143, 145-146: *Aureobasidium pullulans*; Lane 5, 12-13, 20-21, 26, 32, 56: *Fungal sp.*; Lane 30, 34, 38, 78: *Cryptococcus albidus*; Lane 42-43, 63: *Rhodotorula mucilaginosa*; Lane 48, 59: *Cryptococcus aerius*; Lane 62: *Sporidiobolus pararoseus*; Lane 75, 128, 144: *Candida pimensis*; Lane 76: *Mortierella indohii*; Lane 83, 112: *Sporidiobolus salmonicolor*; Lane 88: *Cryptococcus magnus*; Lane 89, 100: *Metschnikowia sp.*; Lane 90, 139: *Pseudozyma hubeiensis*; Lane 92: *Metschnikowia pulcherrima*; Lane 33, 41, 49, 86, 94, 106-107, 109, 113, 115-117, 119-120, 125-126, 129, 131-133, 135-137, 141-142: unidentified; GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. (a) Lane 1-76. (b) Lane 77-146. N: Negatif kontrol

Tablo 28. 2011 yılı Erkençe ve Gemlik zeytinlerinden, zeytin yapraklarından ve zeytin bahçelerinin hava örneklerinden maya izolatlarının kültürel, API ve moleküler yöntemlerle tanımlama sonuçlarının karşılaştırması

İzolat Kodu	Kültürel Tanımlama	API Kit Tanımlama		Moleküler Tanımlama		
			MAX ID (%)		MAX ID (%)	GenBank Accession Number
4-HO	<i>Candida guilliermondii</i> (see also <i>C. famata</i> and <i>C. norvegensis</i>)	<i>Candida guilliermondii</i>	90,2	<i>Candida diddensiae</i>	99	KC253978.1
5-HO	<i>Candida guilliermondii</i> (see also <i>C. famata</i> and <i>C. norvegensis</i>)	<i>Candida guilliermondii</i>	90,2	<i>Candida diddensiae</i>	99	KC253978.1
6-HO	<i>Candida guilliermondii</i> (see also <i>C. famata</i> and <i>C. norvegensis</i>)	<i>Candida guilliermondii</i>	90,2	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100	HF545662.1
7-HO	if Galacticol +, <i>Candida haemulonii</i> ; if -, <i>Candida glabrata/C.norvegensis</i> (<i>Pichia norvegensis</i>)	-	-	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100	HF545662.1
9-HO	<i>Candida guilliermondii</i> (see also <i>C. famata</i> and <i>C. norvegensis</i>)	<i>Candida guilliermondii</i>	88,7	<i>Debaryomyces hansenii</i>	94	HF545662.1
9b1-HO	if Galacticol +, <i>Candida haemulonii</i> ; if -, <i>Candida glabrata/C.norvegensis</i> (<i>Pichia norvegensis</i>)	-	-	unidentified	-	-
9b2-HO	<i>Candida famata</i> if Galacticol +, <i>Candida haemulonii</i> ; if -, <i>Candida glabrata/C.norvegensis</i> (<i>Pichia norvegensis</i>)	<i>Candida famata</i>	99,8	<i>Debaryomyces hansenii</i>	94	HF545662.1
10-HO		-	-	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99	HF545662.1
11-HO	<i>Candida tropicalis</i> if DBB +, <i>Trichosporon avoides</i> complex. If -	<i>Candida lusitaniae</i>	81,5	<i>Metschnikowia viticola</i>	98	NR_077083.1
18-HL	, <i>Geotrichum fermentans</i> if Galacticol +, <i>Candida haemulonii</i> ; if -, <i>Candida glabrata/C.norvegensis</i> (<i>Pichia norvegensis</i>)	<i>Trichosporan asahii</i>	-	<i>Metschnikowia viticola</i>	99	EU555304.1
19-HL		<i>Trichosporan asahii</i>	-	unidentified	-	-

20-HL	<i>Cryptococcus laurentii</i> if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida tropicalis</i> /C.	<i>Cryptococcus humicola</i>	76,4	<i>Candida zeylanoides</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>	92 97	FR676936.1 AB500695.1
21-HO	<i>viswanathii</i> if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida tropicalis</i> /C.	<i>Candida lusitanae</i>	52,1	<i>Metschnikowia viticola</i>	98	NR_077083.1
22-HO	<i>viswanathii</i> if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida tropicalis</i> /C.	<i>Candida lusitanae</i>	52,1	<i>Metschnikowia viticola</i>	98	NR_077083.1
23-HO	<i>viswanathii</i> if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida tropicalis</i> /C.	<i>Candida lusitanae</i>	52,1	<i>Metschnikowia viticola</i>	98	NR_077083.1
24-HO	<i>viswanathii</i> if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida tropicalis</i> /C.	<i>Candida lusitanae</i>	52,1	<i>Metschnikowia viticola</i>	98	NR_077083.1
25-HO	<i>viswanathii</i> if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida tropicalis</i> /C.	<i>Candida lusitanae</i>	52,1	<i>Metschnikowia viticola</i>	98	NR_077083.1
26-HO	<i>viswanathii</i> if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida tropicalis</i> /C.	<i>Candida lusitanae</i>	52,1	<i>Metschnikowia viticola</i>	98	NR_077083.1
27-HO	<i>viswanathii</i> if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida tropicalis</i> /C.	<i>Candida lusitanae</i>	52,1	<i>Metschnikowia viticola</i>	98	NR_077083.1
28-HO	<i>viswanathii</i> if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida tropicalis</i> /C.	<i>Candida lusitanae</i>	52,1	<i>Metschnikowia viticola</i>	98	NR_077083.1
29-HO	<i>viswanathii</i> <i>Candida guilliermondii</i> (see also <i>C. famata</i> and <i>C. norvegensis</i>)	<i>Candida lusitanae</i>	52,1	<i>Metschnikowia viticola</i>	98	NR_077083.1
30-HO	if Galacticol +, <i>Candida haemulonii</i> ; if -, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida famata</i>	78,4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	98	JX462673.1
31-HO	if Galacticol +, <i>Candida haemulonii</i> ; if -, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	68,1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	HQ267771.1
32-HO	<i>cerevisiae</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	99,8			

	if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida</i> <i>tropicalis/C.</i>			<i>Metschnikowia</i> <i>pulcherrima</i>	97	EU137672.1
33-HO	<i>viswanathii</i>	<i>Candida</i> <i>lusitanae</i>	52,1			
	if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida</i> <i>tropicalis/C.</i>			<i>Metschnikowia</i> <i>viticola</i>	98	NR_077083.1
34-HO	<i>viswanathii</i>	<i>Candida</i> <i>lusitanae</i>	52,1			
	if Galacticol +, <i>Candida haemulonii</i> ; if -, <i>Candida</i> <i>glabrata/C.norvegen</i> <i>sis</i> (<i>Pichia</i> <i>norvegensis</i>)	-		<i>Metschnikowia</i> <i>viticola</i>	98	NR_077083.1
35-HO	if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida</i> <i>tropicalis/C.</i>	<i>Candida</i> <i>lusitanae</i>	52,1			
36k-HO	<i>viswanathii</i>			<i>Metschnikowia</i> <i>viticola</i>	98	NR_077083.1
	if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida</i> <i>tropicalis/C.</i>	<i>Candida</i> <i>lusitanae</i>	52,1			
37-HO	<i>viswanathii</i>			<i>Metschnikowia</i> <i>viticola</i>	98	NR_077083.1
	if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida</i> <i>tropicalis/C.</i>	<i>Candida</i> <i>lusitanae</i>	52,1			
38-HO	<i>viswanathii</i>			<i>Metschnikowia</i> <i>viticola</i>	98	NR_077083.1
	if Rhamnose +, <i>Candida lusitanae</i> ; if -, <i>Candida</i> <i>tropicalis/C.</i>	<i>Candida</i> <i>lusitanae</i>	52,1			
39-HO	<i>viswanathii</i>			<i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i>	99	HQ267771.1
	if Galacticol +, <i>Candida haemulonii</i> ; if -, <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	<i>Cryptococcus</i> <i>uniguttulatus</i>	99,9			
40-GL	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	<i>Cryptococcus</i> <i>uniguttulatus</i>	99,9	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	99	FN428885.1
41-GL	<i>Cryptococcus</i> <i>laurentii</i>	<i>Cryptococcus</i> <i>laurentii</i>	98,8	<i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i>	99	HQ267771.1
42-GL	if DBB +, <i>Trichosporon</i> <i>avoides</i> complex. If - , <i>Geotrichum</i> <i>capitatum</i> . But pink: <i>R.mucilaginosa</i>	<i>Geotrichum</i> <i>capitatum</i>	66,6	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	99	FN428885.1
43a-GO	if Galacticol +, <i>Candida haemulonii</i> ; if -, <i>Candida</i> <i>glabrata/C.norvegen</i> <i>sis</i> (<i>Pichia</i> <i>norvegensis</i>)	-		<i>unidentified</i>	-	-
43k-GO	if Methanol +, <i>Pichia</i> <i>angusta</i> ; if-, <i>P.jadinii</i>	<i>Stephanoascus</i> <i>ciferri</i>	99,9			
44-HL	<i>Candida famata</i>	<i>Stephanoascus</i>	99,8	<i>unidentified</i>	-	-
45-GO						

	if DBB +, <i>Trichosporon</i> <i>avoides</i> complex. If - , <i>Geotrichum</i>	<i>ciferri</i>		<i>unidentified</i>	-	-
46-HL	<i>fermentans</i>	<i>Trichosporan</i> <i>asahii</i>	99,9			
48-HO	<i>Candida famata</i> <i>Candida</i> <i>guilliermondii</i> (see also <i>C. famata</i> and <i>C. norvegensis</i>)	<i>Stephanoascus</i> <i>ciferri</i>	99,8	<i>unidentified</i>	-	-
49-GL	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	<i>Cryptococcus</i> <i>laurentii</i>	99,4	<i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i>	99	KC544477.1
50-GL		<i>Cryptococcus</i> <i>laurentii</i>	99,4	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	99	EF190221.1
51-GL	<i>Candida famata</i> <i>Candida</i> <i>guilliermondii</i> (see also <i>C. famata</i> and <i>C. norvegensis</i>)	<i>Cryptococcus</i> <i>laurentii</i>	98,2	<i>unidentified</i>	-	-
52-GL		<i>Stephanoascus</i> <i>ciferri</i>	99,9			
53-HL	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i> 2	99,5	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	99	EF190221.1
54-HL	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i> 2	99,9	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	99	EF190221.1
55-HL	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	<i>Trichosporan</i> <i>asahii</i>	99,9	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	99	EF190221.1
56-HL	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i> 2	99,9	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>	99	EF190221.1

Tablo 29. 2012 yılı Erkençe ve Gemlik zeytinlerinden, zeytin yapraklarından ve zeytin bahçelerinin hava örneklerinden maya izolatlarının kültürel, API ve moleküler yöntemlerle tanımlama sonuçlarının karşılaştırması

Izolat Kodu		Moleküler Tanımlama	
		MAX ID (%)	GenBank Accession Number
1-A	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
2-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
3-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
4-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
5-GO	<i>Fungal sp.</i>	96	KF212258.1
6-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
7-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
8-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
9-GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
10-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
11-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
12-HL	<i>Fungal sp.</i>	96	KF212258.1
13-HL	<i>Fungal sp.</i>	96	KF212258.1
14-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
15-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
16-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
17-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
18GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
19-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
20-GO	<i>Fungal sp.</i>	96	KF212258.1
21-HO	<i>Fungal sp.</i>	96	KF212258.1
22-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
23-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
24-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
25-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
26-HL	<i>Fungal sp.</i>	96	KF212258.1
27-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
28-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
29-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
30-HL	<i>Cryptococcus albidus</i>	99	KC254020.1
31-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
32-GL	<i>Fungal sp.</i>	96	KF212258.1
33-HL	<i>unidentified</i>	-	-
34-GL	<i>Cryptococcus albidus</i>	99	KC254020.1
35-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
36-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
37-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	95	HQ267773.1
38-HL	<i>Cryptococcus albidus</i>	99	KC254020.1
39-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
40-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
41-GL	<i>Unidentified</i>	-	-
42-A	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	90	KC544481.1
43-A	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	90	KC544481.1

44-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
45-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
46-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
47-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
48-HL	<i>Cryptococcus aerius</i>	93	JN942258.1
49-HL	<i>Unidentified</i>	-	-
50-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
51-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
52-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
53-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
54-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
55-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
56-GL	<i>Fungal sp.</i>	96	KF212258.1
57-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
58-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
59-HL	<i>Cryptococcus aerius</i>	98	AF145324.1
60-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
61-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX462673.1
62-HL	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	97	JQ425362.1
63-HL	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99	KC544481.1
64-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
65-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
66-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
67-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
68-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
69-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
70-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
71-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
72-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
73-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	88	KC544477.1
74-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
75-GO	<i>Candida pimensis</i>	96	FJ623594.1
76-GO	<i>Mortierella indohii</i>	83	EU688967.1
77-GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
78-HO	<i>Cryptococcus albidus</i>	99	KC254020.1
79-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
80-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
81-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
82-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	90	HQ267773.1
83-HO	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	99	AF444611.1
84-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	89	HQ267771.1
85-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	89	HQ267771.1
86-A	<i>Unidentified</i>	-	-
87-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	91	HQ267773.1
88-GL	<i>Cryptococcus magnus</i>	100	EU413891.1
89-GO	<i>Metschnikowia sp.</i>	97	DQ367882.1
90-HO	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	92	HQ832814.1
91-GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	KC544477.1
92-GO	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	97	EU137672.1
93-GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	KC544477.1
94-GO	<i>Unidentified</i>	-	-

95-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
96-GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
97-GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
98-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
99-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
100-GO	<i>Metschnikowia sp.</i>	97	DQ367882.1
101-GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
102-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
103-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
104-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
105-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
106-HL	<i>Unidentified</i>	-	-
107-HL	<i>Unidentified</i>	-	-
108-GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
109-HL	<i>Unidentified</i>	-	-
110-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
111-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
112-GL	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	99	AF444611.1
113-HO	<i>Unidentified</i>	-	-
114-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
115-HL	<i>Unidentified</i>	-	-
116-GL	<i>Unidentified</i>	-	-
117-HL	<i>Unidentified</i>	-	-
118-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
119-HO	<i>Unidentified</i>	-	-
120-HO	<i>Unidentified</i>	-	-
121-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
122-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
123-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
124-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
125-HO	<i>Unidentified</i>	-	-
126-GL	<i>Unidentified</i>	-	-
127-GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
128-HL	<i>Candida pimensis</i>	96	FJ623594.1
129-HL	<i>Unidentified</i>	-	-
130-GL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
131-HO	<i>Unidentified</i>	-	-
132-HO	<i>unidentified</i>	-	-
133-HL	<i>Unidentified</i>	-	-
134-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
135-HO	<i>Unidentified</i>	-	-
136-GO	<i>Unidentified</i>	-	-
137-GL	<i>Unidentified</i>	-	-
138-HO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
139-A	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	92	HQ832814.1
140-A	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
141-HL	<i>Unidentified</i>	-	-
142-HO	<i>Unidentified</i>	-	-
143-GO	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1
144-GL	<i>Candida pimensis</i>	96	FJ623594.1
145-HL	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	FJ228168.1

HO: Hurma zeytini, ERK: Erkence zeytini, HL: Hurma zeytin yaprağı, A; Hurma-Erkence bahçesi hava örneği

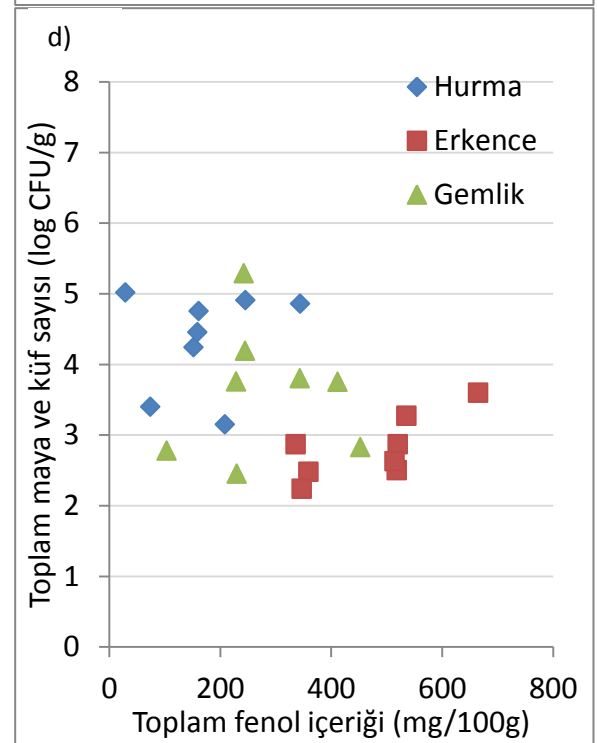
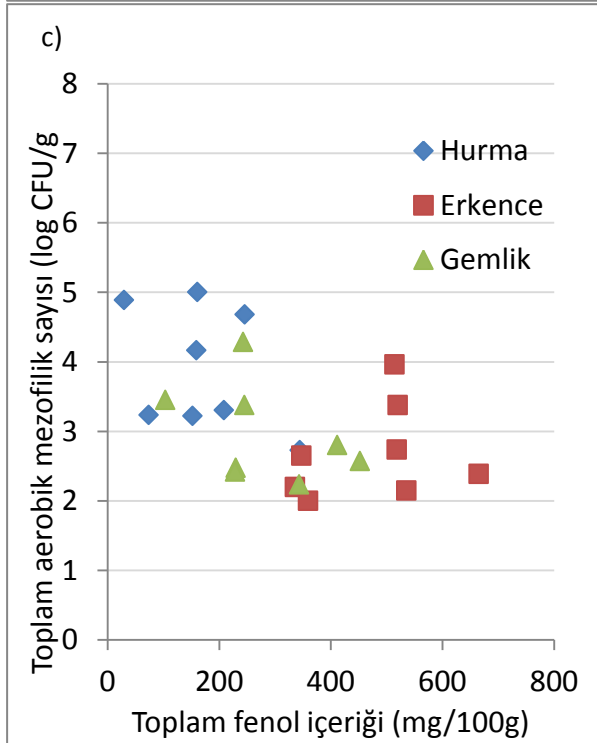
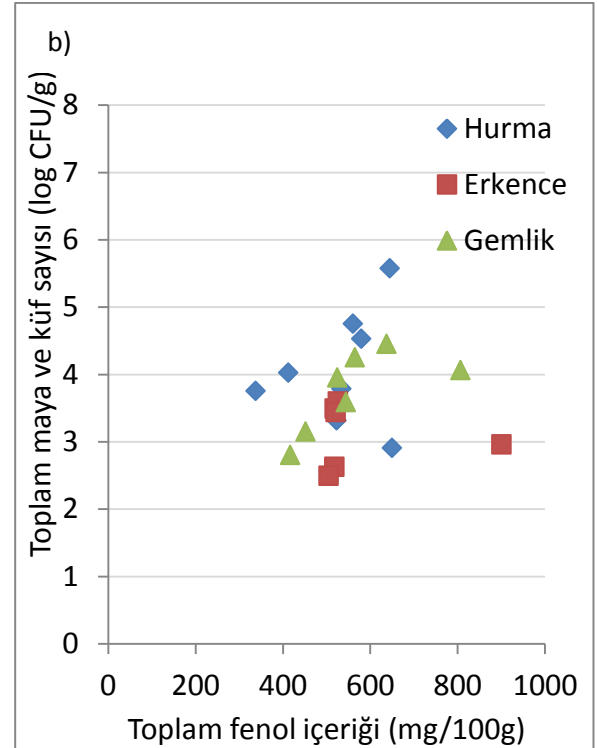
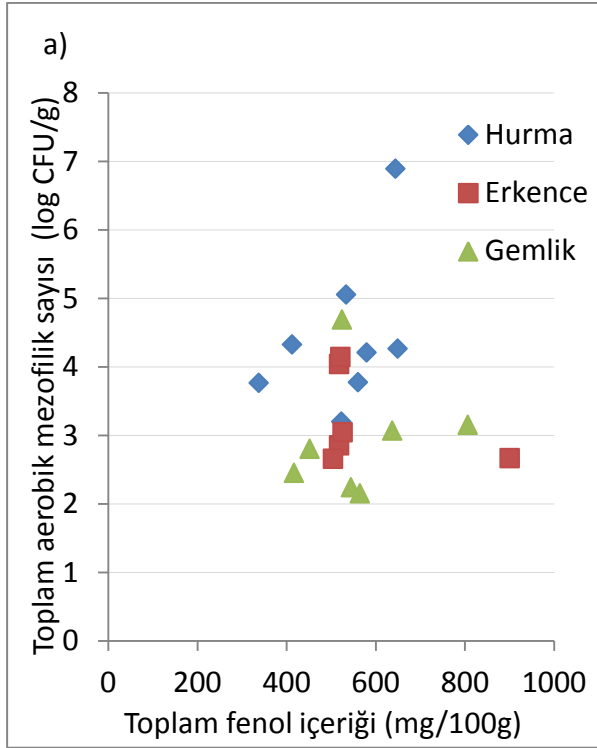
4.3. Kimyasal ve Mikrobiyolojik Veriler Arasındaki Bağlantılar

Elde edilen kimyasal ve mikrobiyolojik veriler arasında herhangi bir bağlantı olup olmadığını tespit etmek amacı ile kimyasal parametreler (toplam fenol içeriği, önemli fenollerin konsantrasyonları, toplam şeker ve toplam organik asit miktarları), toplam aerobik mezofil ve toplam maya ve küf sayılarına karşı çizdirilmiştir.

Yıllara göre her üç zeytin tipi için de toplam fenol içeriğine karşı toplam mezofil bakteri ve toplam maya ve küf grafikleri Şekil 35'de verilmiştir. Lineer bir trend görülmemekle birlikte Hurma genel olarak diğer zeytin tiplerine göre daha yüksek toplam aerobik mezofilik mikroorganizma ve toplam maya ve küf sayısına sahipken bu zeytin için toplam fenol içeriği daha düşüktür. Bu durum ikinci yıl örneklerinde daha belirgindir. Buna karşılık Erkence, üç zeytin arasında en yüksek fenol içeriğine ve daha düşük seviyelerde mezofilik mikroorganizma ve maya ve küf sayılarına sahip olan zeytindir. Bu nedenle zeytin üzerinde bulunan mikroorganizma sayısının zeytinin toplam fenol içeriğinden etkilendiği sonucuna varılabilir. Fenolik bileşenlerin antimikrobiyal özellikleri olduğu çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Bu nedenle bu sonuç beklenen bir durumdur. Konuyu daha detaylı incelemek amacı ile zeytinde bulunan başlıca bazı fenolik bileşenlere karşı da mikroorganizma sayıları çizdirilmiştir (Şekil 36-37).

Oleuropeine karşı mezofilik mikroorganizma ve maya ve küf sayımları iki hasat yılı için Şekil 36 a-d'de gösterilmiştir. Bu grafiklere göre Hurma, genel olarak daha düşük oleuropein içerirken mezofilik bakteri ve maya ve küf sayıları daha yüksektir. İlk yıl Gemlik zeytininin oleuropein miktarı diğerlerine göre daha yüksektir ve artan oleuropein miktarı ile mezofilik bakteri sayısının düştüğü görülmektedir. Maya ve küf sayımlarına bakıldığında yine Hurma için diğerlerine göre daha yüksek sayımlar görülmekle birlikte mezofilik bakteri sayılarında olduğunun aksine fenolik madde miktarı ile bağlantı çok belirgin değildir.

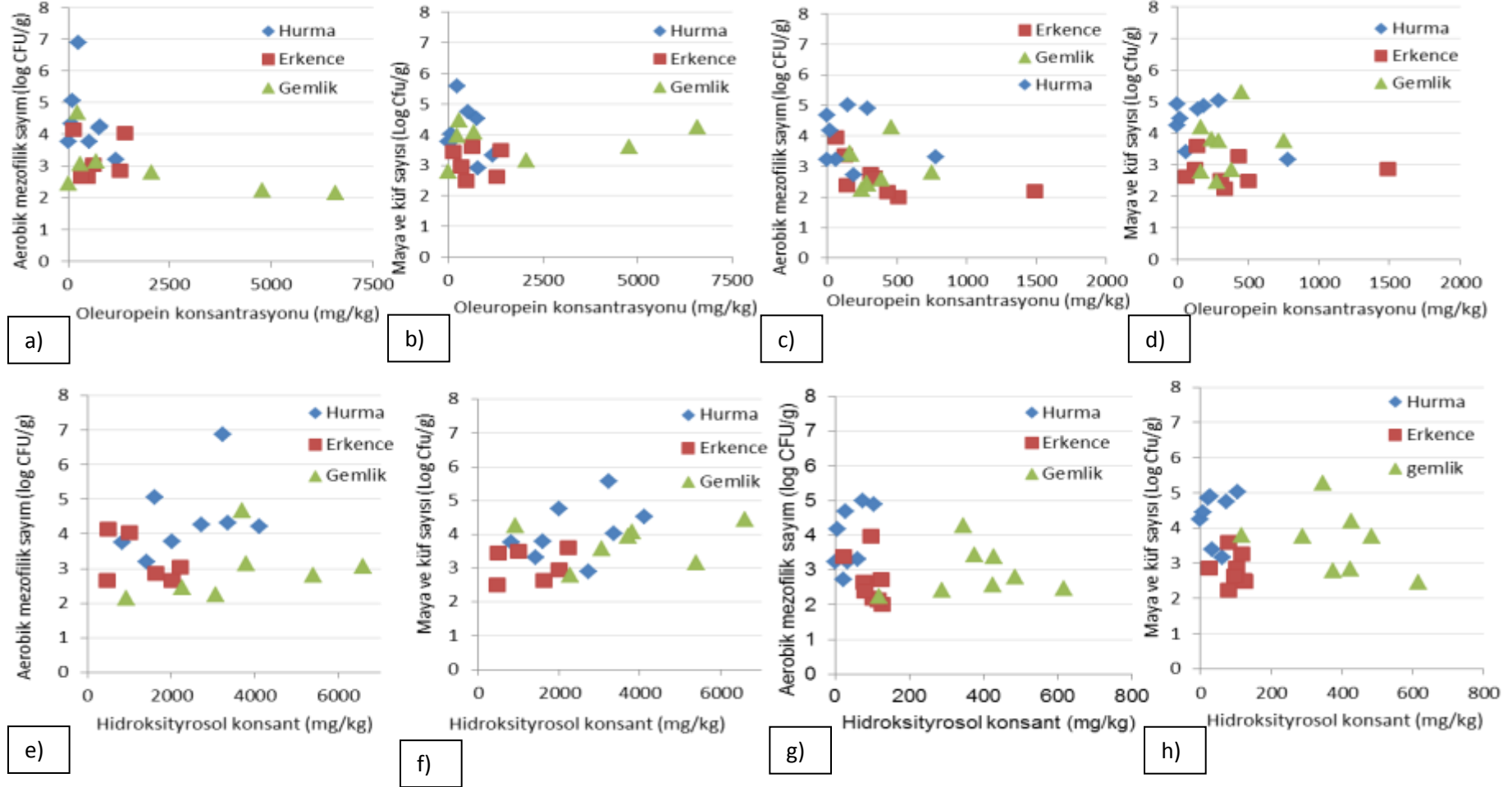
Şekil 36 e-h hidroksityrosol ve mikrobiyal populasyon arasındaki ilişkileri göstermektedir. İki hasat yılında da Gemlik zeytini daha yüksek oranlarda hidroksityrosol içermektedir ancak Gemlik zeytininde maya ve küf sayıları Hurma ile aynı seviyelerdedir. Ayrıca ilk yıl Hurma'nın hidroksityrosol içeriği Erkence'den daha yüksek olmasına rağmen Hurma'nın mezofilik bakteri sayısı Erkence'den daha fazladır. İkinci yılda ise Hurma ve Erkence için hidroksityrosol seviyeleri hemen hemen aynı aralıkta değişmesine rağmen yine Hurma'nın mezofilik bakteri ve maya ve küf sayıları daha yüksektir. Bu da hidroksityrosol'un



Şekil 35. 2011/12 toplam fenol miktarı verilerine karşı a) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı b) toplam maya ve küf sayısı; 2012/13 toplam fenol miktarı verilerine karşı c) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı d) toplam maya ve küf sayısı

2011/12

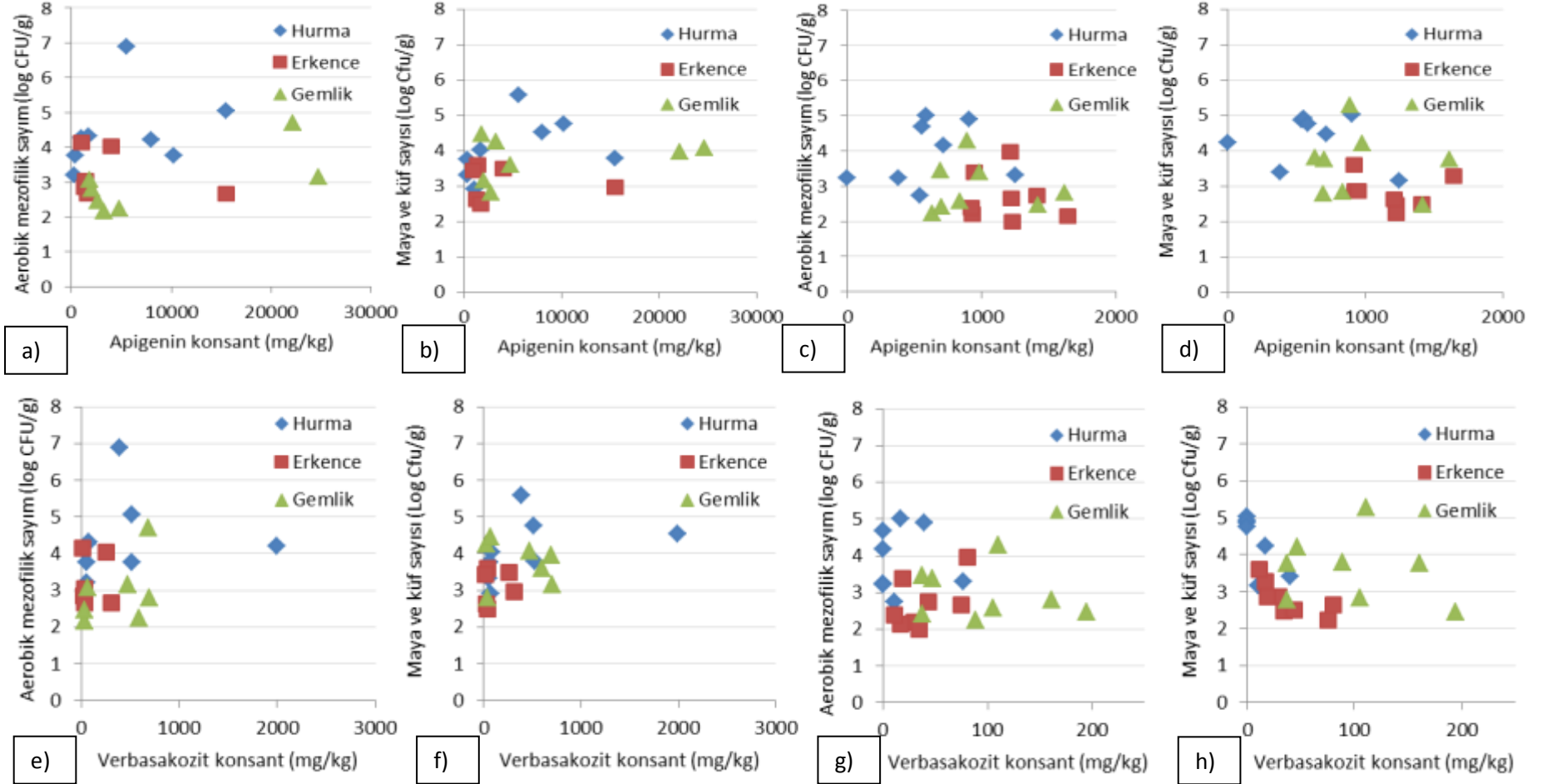
2012/13



Şekil 36. İki hasat yılı oleuropein miktarı verilerine karşı toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı (a ve c) ile toplam maya ve küf sayısı (b ve d) ve iki hasat yılı hidroksityrosol miktarı verilerine karşı toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı (e ve g) ile toplam maya ve küf sayısı (f ve h)

2011/12

2012/13



Şekil 37. İki hasat yılı apigenin miktarı verilerine karşı toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı (a ve c) ile toplam maya ve küf sayısı (b ve d) ve iki hasat yılı verbaskozit miktarı verilerine karşı toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı (e ve g) ile toplam maya ve küf sayısı (f ve h)

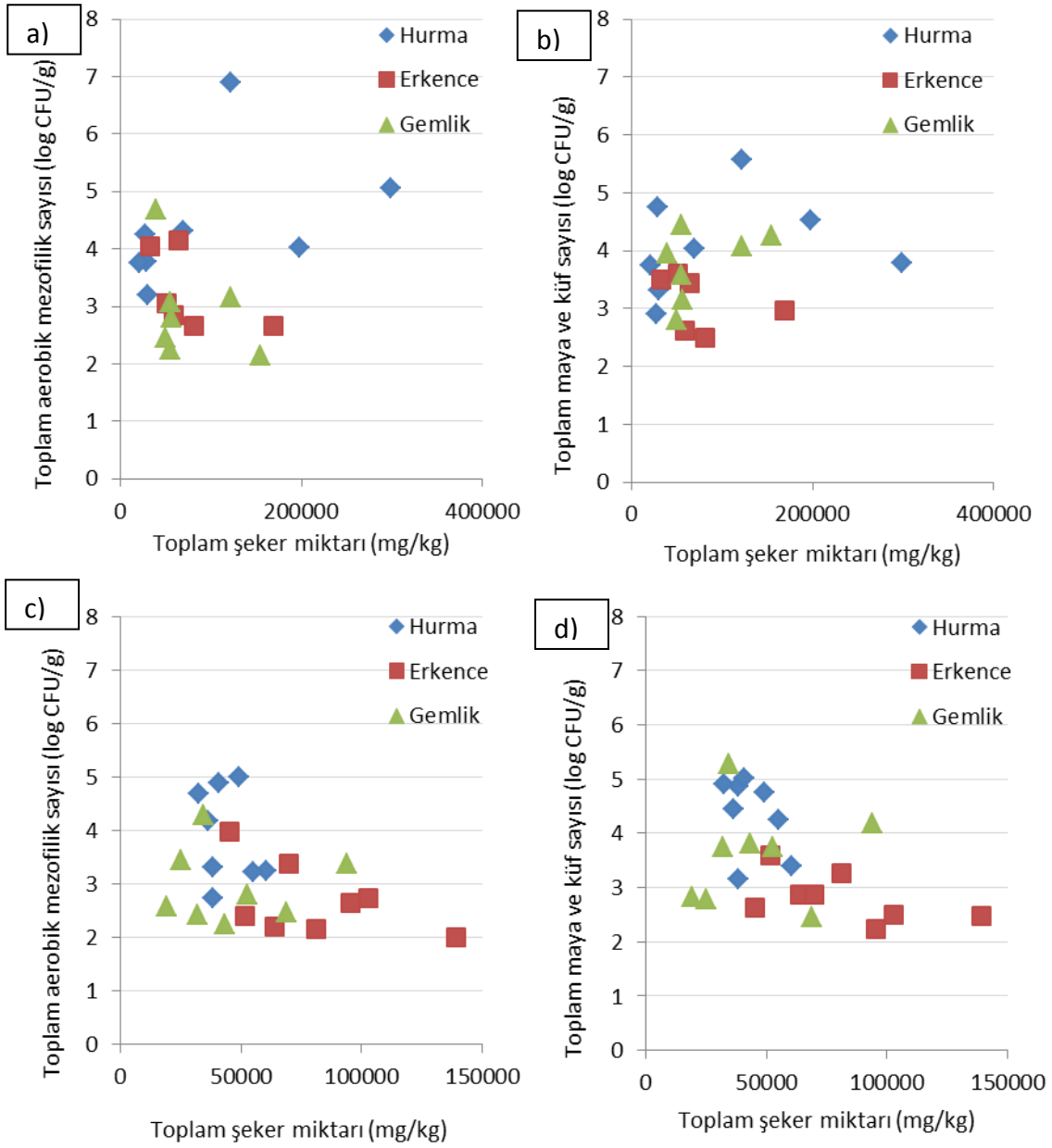
bu zeytinlerin florası üzerinde konsantrasyona bağlı bir antimikrobiyal etkisi olmadığını göstermektedir.

Apigenin ile zeytinlerin mikrobiyal populasyonları arasındaki bağlantı ilk hasat yılı için çok belirgin değildir (Şekil 37 a-d). Ancak ikinci hasat yılında daha düşük apigenin konsantrasyonuna sahip olan Hurma'nın mezofilik bakteri, maya ve küf sayılarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Yine yüksek apigenin seviyelerine sahip olan Erkence için daha düşük mikrobiyal sayılar söz konusudur. İlk yıla ikinci yıl arasındaki farklılık bu fenolik bileŐenin konsantrasyonundan kaynaklanıyor olabilir: ikinci yıl için apigenin konsantrasyonları bütün zeytinler için ilk yıla göre çok daha düşüktür. Dolayısı ile ikinci yılda konsantrasyona bağlı bir etki varken ilk yıl belirli bir seviyenin üstünde etki, konsantrasyondan bağımsız bir hale gelmiŐ olabileceği gibi etki yok olmuş da olabilir.

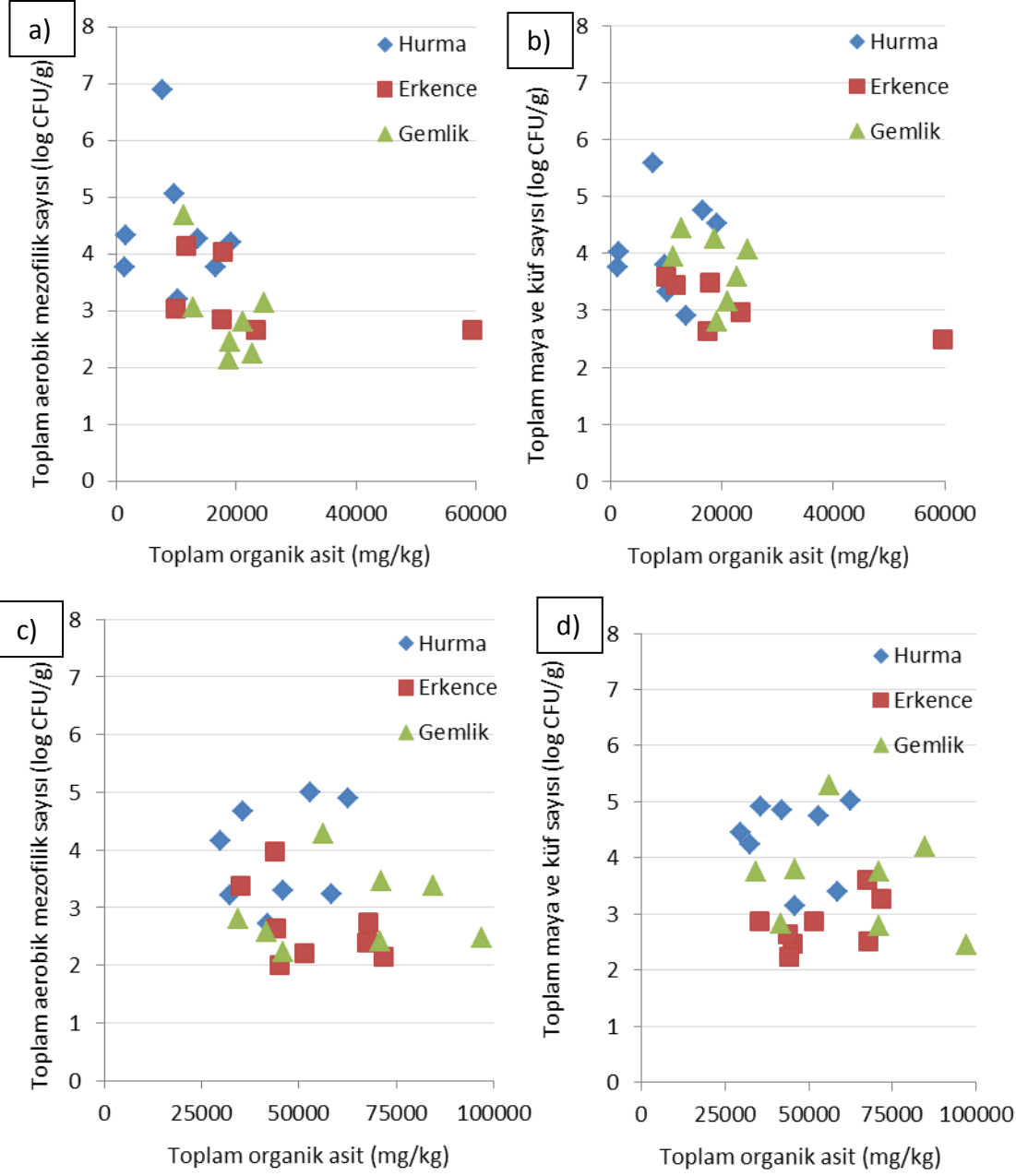
İlk hasat yılında diğer bir fenolik bileşen olan verbaskozit konsantrasyonu ile mikrobiyal sayımlar arasında bir bağlantı görülmemiştir (Şekil 37 e-h). İkinci yıl ise Gemlik diğer zeyinlere göre daha geniş bir aralıkta verbaskozit değerlerine sahipken maya ve küf sayıları Hurma ile aynı seviyelerdedir. Yine Hurma ve Erkence benzer seviyelerde olmasına rağmen Hurma daha yüksek mezofilik bakteri ve maya ve küf sayılarına sahiptir. Bu nedenle verbaskozit ile zeytin üzerinde bulunan mikrobiyal populasyon arasında bir bağlantı görülmediği söylenebilir.

Zeytinlerin toplam Şeker içeriklerine karşılık aerobik mezofilik bakteri ve maya ve küf sayıları Şekil 38'de gösterilmiştir. İlk yıl zeytinlerin Şeker içerikleri hemen hemen benzer aralıklarda iken Hurma en yüksek bakteri ve maya ve küf sayılarına sahiptir. İkinci yılda ise Erkence'nin toplam Şeker seviyeleri diğerlerine göre dah geniş bir aralıkta ve daha yüksek seviyelerde iken mikroorganizma sayıları daha düşüktür. Bu nedenle Şeker miktarı ile mikroorganizma sayısı arasında bir bağlantı olduğu söylenebilir. Artan Şeker konsantrasyonunun mikroorganizmaların büyümesini engelleyici rolü bilinen bir durumdur.

Toplam organik asit miktarları da aerobik mezofilik bakteri ve maya ve küf sayılarına göre çizdirilmiştir (Şekil 39). Toplam organik asit miktarları bütün zeytin tipleri için benzer seviyelerdedir ve mikroorganizma sayılar ile asit içeriği arasında bir bağlantı kurulamamıŐtır.



Şekil 38. 2011/12 toplam şeker miktarı verilerine karşı a) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı, b) toplam maya ve küf sayısı; 2012/13 toplam şeker miktarı verilerine karşı c) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı, d) toplam maya ve küf sayısı



Şekil 39. 2011/12 toplam organik asit miktarı verilerine karşı a) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı, b) toplam maya ve küf sayısı; 2012/13 toplam organik asit miktarı verilerine karşı c) toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı, d) toplam maya ve küf sayısı

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada Hurma (dalında tatlılaşan Erkence zeytini), Erkence ve Gemlik tipi zeytinlerin kimyasal ve mikrobiyolojik karakterizasyonu olgunlaşma sürecinde iki hasat yılı boyunca izlenmiştir ve özellikle dalında tatlılaşmaya neden olan faktörler aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Hurma zeytinin toplam fenol içeriğinin ve hemen hemen fenol profilindeki tüm bileşiklerin kompozisyonlarının Erkence ve Gemlik zeytinlerine göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Çok değişkenli bir istatistiksel analiz tekniği olan PCA, fenol içeriğine göre Hurma, Erkence ve Gemlik tipleri arasında ayrışma sağlamaktadır. Ayrıca fenol profili hasat yılına göre de farklılaşmaya neden olmaktadır.

Glukoz ve manitol, sözü edilen üç zeytin tipi için başlıca şeker ve polyol olarak belirlenmiştir. Bu zeytinlerde tespit edilen başlıca organik asitler ise sitrik ve malik asitlerdir. PCA'ye göre şeker ve organik asit profili zeytin türü açısından bir farklılaşmaya neden olmazken hasat yılına göre bir ayrım sağlamışlardır.

Oleik asit, beklediği gibi bütün zeytin tipleri için başlıca yağ asididir. Hurma, linoleik asit içeriği en yüksek olan zeytindir. Yağ asidi profili, fenol profilinde olduğu gibi zeytin tiplerine ve hasat yılına bağlı olarak ayrışma sağlayan bir parametredir.

Daha önceki çalışmalarda dalında tatlılaşma sürecinin β -glukosidaz ve esteraz enzimlerinin aktiviteleri ile ilgili olabileceği ve bunun sonucunda da fenolik bileşiklerin kompozisyonlarında düşüş olduğu bildirilmiştir (Jemai vd., 2009). Bu çalışma önceki çalışmayı doğrulamakta ayrıca sadece fenollerin değil yağ asitlerinin de bu süreçten etkilendiğini ortaya koymaktadır. Bu süreçte Hurma'nın diğerlerine göre daha düşük olan oleik asit/linoleik asit ve MUFA/PUFA değerlerinden dolayı desaturase enzim aktivitesinin de arttığı düşünülmektedir. Bu hipotez, literatürde bu yöndeki ilk bildirimdir.

Hurma zeytinden izole edilen mikroorganizmalar Erkence ve Gemlik zeytinlerine göre oldukça farklılık ve çeşitlilik göstermekte ve potansiyel bitki patojenlerini, fırsatçı (opportunistic) insan patojenlerini, mikotoksin üretebilme potansiyeli olan küf türlerini içermektedir. Botryosphaeria familyasının 18 anamorphu mevcuttur. *Diplodia* türleri bu anamorphlardan biridir ve *Phoma* section içinde yer almaktadır ve Hurma zeytinde saptanmıştır. Hurma zeytinden *Phoma* türlerine spesifik ITS ve ACT genlerinin kullanılması suretiyle gerçekleştirilen direkt *Phoma* türlerinin tanımlanması sonucunda Hurma zeytinin olgunlaşma süreci boyunca bu türün ilk haftadan başlamak üzere bulunduğu görülmüştür. Hurma zeytinde mikroorganizma seviyelerinin diğer zeytin çeşitlerine göre yüksekliği bu zeytinin daha düşük olan fenol içeriği ile ilişkilendirilebilir. Ancak diğer incelenen kimyasal parametreler ile zeytinlerin mikrobiyal yükleri arasında bir bağlantı gözlenmemiştir.

Hurma zeytinin düşük su aktivitesinde gelişebilme özelliğine sahip fungal yükü, işlem görmeyen bu zeytin ürününün potansiyel bozulma florasını oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra tuz içermeyen veya salamura yapılmadan, ağacından doğrudan piyasaya sağlıklı alternatif bir ürün olarak sunulabilen Hurma zeytini, mikrobiyal yükü ve tanımlanan patojen bakterileri azaltmak ve kontrol edebilmek amacıyla yıkanarak tüketime sunulmalı ve tehlikeleri kontrol

edebilmek için ambalajlanmalıdır. Çalışmanın sonuçları gıda güvenliği uygulamaları ve HACCP yaklaşımının gerekliliğini göstermektedir.

6. PROJE ÇIKTILARI

Rapor tarihine kadar, bu projeden elde edilen veriler ile aşağıda listesi verilen bilimsel yayınlar ve tezler hazırlanmıştır:

1. Aktas, A. B., Ozen, B., Tokatli, F., Sen I. Phenolics Profile of a Naturally Debittering Olive in Comparison to Regular Olive Varieties. J. Sci. Food Agric., DOI:10.1002/jsfa.6308.
2. Baysal, A. H., Özcan, D., Karslı, G. S. 'Hurma' Zeytininden İzole Edilen *Aspergillus* ve *Penicillium* Türleri. TGDF Gıda Kongresi, 12-14 Kasım 2013, Side, Antalya.
3. Canal, C., Baysal, A. H., Ozen, B. Characterization of Yeast Flora of 'Hurma' Olives Grown in Karaburun Peninsula in Turkey. 2nd International Conference on Microbial Diversity, 23-25 Ekim 2013, Torino, İtalya.
4. Karslı, G. S., Baysal, A. H. Characterization and Identification of Bacteria Isolated from 'Hurma' Olive. 2nd International Conference on Microbial Diversity, 23-25 Ekim 2013, Torino, İtalya.
5. Ozcan, D., Baysal, A. H. DNA-Based Molecular Characterization of Fungi Isolated from 'Hurma' Olive. 2nd International Conference on Microbial Diversity, 23-25 Ekim 2013, Torino, İtalya.
6. Aktaş, A. B., Şen, İ., Özen, B., Tokatlı F. Phenolics Composition of a Naturally Debittered Olive. EUROFOODCHEM XVII, 7-10 Mayıs 2013, İstanbul.
7. Baysal, A.H, Karslı, G.S. Fungi Isolated From 'Hurma' Olives Grown in Karaburun Peninsula. CBS One Fungus: Which Gene, 10-11 Nisan 2013, Amsterdam, Hollanda.
8. Aktaş, A. B., Şen, İ., Özen, B., Tokatlı F. Karaburun Yarımadasında Yetişen Hurma Zeytinin Bazı Kimyasal Özellikleri. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 2012, Hatay.
9. Canal, C., Karslı, G., Baysal, H., Özen B. Şarap Fermantasyonu ve Hurma Zeytinin Olgunlaşma Sürecinde Mikrobiyal Değişimin İncelenmesi. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 2012, Hatay.
10. Karslı, G., Canal, C., Baysal, H., Özen, B. Characterization of Microbial Flora of 'Hurma' Olives Grown in Karaburun Peninsula in Turkey. 1st North European Congress on Food, 22-24 Nisan 2012, St. Petersburg.
11. Aktaş, A. B. Karaburun Yarımadasında Yetişen 'Hurma' Zeytininin Kimyasal Karakterizasyonu, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2013.
12. Karslı, G. S. Karaburun Yarımadasında Yetişen 'Hurma' Zeytininin Mikrobiyolojik Karakterizasyonu, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2013.

KAYNAKLAR

- Alkan, D., Tokatli, F., Ozen, B. 2012. "Phenolic characterization and geographical classification of commercial extra virgin olive oils produced in Turkey", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 261-268.
- Andersen, B., Krøger, E., Roberts, R.G. 2002. "Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups", *Mycological Research*, 106, 170–182.
- Andreadou, I., Iliodromitis, E., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A., Kremastinos, D. 2006. "The Olive constituent oleuropein exhibits antiischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits", *Journal of Nutrition*, 136, 2213–2219.
- Arroyo-Lopez, F.N., Duran-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A., Garrido-Fernandez, A. 2006. "Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives", *Food Microbiology*, 23, 791-796.
- Arslan, D., Özcan, M. 2011. "Influence of growing area and harvest date on the organic acid composition of olive fruits from Gemlik variety", *Scientia Horticulturae*, 130, 633-641.
- Aveskamp, M.M., de Gruyter J., Crous P.W. 2008. "Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance", *Fungal Diversity*, 31, 1-18.
- Ayton, J., Mailer, R.J., Haigh, A., Tronson, D., Conlan, D. 2007. "Quality and oxidative stability of Australian olive oil according to harvest date and irrigation", *Journal of Food Lipids*, 14, 138-156.
- Barnett, J.A., Payne R.W., Yarrow, D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification* (3rd ed.) Cambridge, U.K.:Cambridge University Press.
- Bartlett, J. M., Stirling, D. 2003. *PCR Protocols* (Vol. 226). Berlin: Springer.
- Beltran, G., del Río, C., Sánchez, S., Martínez, L. 2004. "Seasonal changes in olive fruit characteristics and oil accumulation during ripening process", *Journal of the Science and Food Agriculture*, 84, 1783-1790.
- Bianco, A., Uccella N. 2000. "Biophenolic components of olives", *Food Research International*, 33, 475-485.
- Boerema, C.H., De Gruyter, J., Noordeloss, M.E., Hamers, M.E.C. 2004. *Differentiation of Specific and Intra-Specific Taxa in Culture, Phoma Identification Manual*. Cambridge, MA, USA: CABI Publishing.
- Bouaziz, M., Chamkha, M., Sayadi, S. 2004. "Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5476–5481.

- Buzcu, N. 1969 "Karaburun Hurma Zeytinin Oluş Sebebinin Tesbiti", <http://www.zae.gov.tr/index.php/projeler/sonuclanmis-projeler/199-yayin-no-3.html>, Son erişim tarihi: 10 Ekim 2013.
- Carbone, I., Kohn, L.M., 1999. "A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes", *Mycologia*, 91, 553-556.
- Cai, J., Roberts, I.N., Collins, M.D. 1996. "Phylogenetic relationships among members of the Ascomycetous yeasts genera *Brettanomyces*, *Debaromyces*, *Dekkera* and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit Rrna gene sequences", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 542-549.
- Cardinal, M.J., Meghrou, J., Lacroix, C., Simard, R.E. 1997. "Isolation of *Lactococcus lactis* strains producing inhibitory activity against *listeria*", *Food Biotechnology*, 11, 129-146.
- Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B., Pozzi, N. 1994. "Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation", *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4142-4147.
- Ciafardini, G., Zullo, B. A. 2000. "β-glucosidase activity in olive brine during the microbiological debittering process", *Advances in Food Science*, 22, 69-76.
- Cooney, G. D., Emerson R. 1964. *Thermophilic Fungi*. San Fransisco: W. H. Freeman and Company.
- Copa-Patino, J.L., Rodriguez, J., Perez-Leblic, M.I. 1990. "Purification and properties of a β-glucosidase from *Penicillium oxalicum* autolysates", *FEMS Microbiology Letters*, 55, 191-196.
- Dağdelen, A., Tümen, G., Özcan, M.M., Dündar, D. 2013. "Phenolics profiles of olive fruits (*Olea europaea* L.) and oils from Ayvalık, Domat and Gemlik varieties at different ripening stages", *Food Chemistry*, 136, 41-45.
- Deak, T. 1995. "Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods," *Trends in Food Science and Technology*, 6, 287-292.
- De Gruyter, J., Noordeloos, M.E. 1992. "Contributions towards a monograph of *Phoma* (*Coeiomyces*) I. 1. Section *Phoma*: taxa with very small Conidia *in vitro*", *Persoonia*, 15, 71-92.
- De Hoog, G.S., Gerrits van den Ende, A.H.G. "Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous *Basidiomycetes*", *Mycoses*, 41, 183-189.
- Domsch, K.H., Gams W., Anderson T.H. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. London: Academic Press.
- European Union Commission. 1991. "Regulation EEC 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis", *Official Journal of European Community*, L248.

- Ergönül, P., Nergiz, C. 2010. "Determination of organic acids in olive fruit by HPLC", Czech Journal of Food Science, 28, 202-205.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch C., Uruburu F., Querol A. 1999. "Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers", International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 329-337.
- Fernandez-Bolanos, J., Fernandez Diez, M. J., Rivas Moreno, M., Gil Serrano, A., Perez Romero, T. 1983. "Azucares y polioles en aceitunas verdes. III. Determinacion cuantitativa por cromatografia gasliquido", Grasas Aceites, 3, 168-171.
- Harji, S., Fedosyuk, H., Peterson, K. R. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. BMC Biotechnology (2004).
- Hinrikson, H.P., Hurst, S.F., Lott, T.J., Warnock, D.W., Morrison, C.J. 2005. "Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species", Journal of Clinical Microbiology, 43, 2092-2103.
- International Olive Council, <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>, Son erişim tarihi: 10 Ekim 2013.
- Issaoui, M., Mechri, B., Echbili, A., Dabbou, S., Yangui, A., Belguith, H., Trigui, A., Hammami, M. 2008. "Chemometric characterization of five Tunisian varietals of *Olea europaea* L. olive fruit according to different maturation indices", Journal of Food Lipids, 15, 277-296.
- Iwen, P.C., Hinrichs, S.H., Rupp, M.E. 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens," Medical Mycology, 40, 87-109.
- James, S.A., Collins, M.D., Roberts, I.N. 1996. "Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*", International Journal of Systematic Bacteriology, 46,189-194.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Sayadi, S. 2009. "Phenolic composition, sugar contents and antioxidant activity of Tunisian sweet olive cultivar with regard to fruit ripening", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 2961-68.
- Joslyn, M. A. 1970. Methods in Food Analysis. Physical, Chemical and Instrumental Methods of Analysis (2nd edition). New York: Academic Press.
- Kailis S., Harris D. 2007. Processing Table Olives. Collingwood: BPA Print Group.
- Kalogereas, S. A. 1932. Table Olives. Athens: Hermes Publications.
- Klich, M.A. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

- Know, K.S., Kang, H.G., Hah, Y.C. 1992. "Purification and characterization of two extracellular β -glucosidases from *Aspergillus nidulans*", FEMS Microbiology Letters, 97, 149-152.
- Korukluoğlu, M., Gürbüz, O., Şahin, İ. 2002. "Taze zeytin mikroflorasında bulunan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi", Tarım Bilimleri Dergisi, 8, 109-113.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P. 2005. "Diversity and technological properties of predominant lactic Acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of gari, a traditional African food", Systematic and Applied Microbiology, 28, 527-540, (2005).
- Kurtzman, C.P. 1992. "rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts", International Journal of Systematic Bacteriology, 42, 1-6.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 1998. The Yeasts, a Taxonomic Study. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Kurtzman, C.P., Fell J. W. 2000. The Yeasts-A Taxonomic Study (4th ed.). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Lavermicocca, R., Gobbetti, M., Corsetti, A., Caputo, L. 1998. "Characterization of lactic acid bacteria isolated from olive phylloplane and table olive brines", Italian Journal of Food Science, 10, 27-39.
- Leontopoulos, D., Siafaka, A., Markaki, P. 2003. "Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and Aflatoxin B₁ production", Food Microbiology, 20, 119-126.
- Looder, J. 1970. Criteria and Methods Used in Classification in the Yeast. A Taxonomic Study, Amsterdam: North-Holland.
- Lopez-Lopez, A., Jiménez-Araujo, A., García-García, P., Garrido-Fernández, A. 2007. "Multivariate analysis for the evaluation of fiber, sugars, and organic Acids in commercial presentations of table olives", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 10803-10811.
- Machowicz-Stefaniak, Z., Zimowska, B. 2000. "Grzyby przenoszone przez nasiona roślin zielarskich", Acta Agrobot, 53, 25-38.
- Machowicz-Stefaniak, Z., Zimowska B., Zalewska E. 2002. "Grzyby zasiedlające różne organy tymianku właściwego *Thymus vulgaris* L. uprawianego na lubelszczyźnie", Acta Agrobot, 55, 185-197.
- Machowicz-Stefaniak, Z., Zalewska, E., Zimowska, B. 2004. "Grzyby zasiedlające nadziemne organy melisy lekarskiej (*Melissa officinalis* L.) i tymianku właściwego (*Thymus vulgaris* L.) uprawianych na lubelszczyźnie", Agriculture, 239, 229-232.

- Manai, H., Haddada, F.M., Trigui, A., Daoud, D., Zarrouk, M. 2007. "Compositional quality of virgin olive oil from two new Tunisian cultivars obtained through controlled crossings", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 600-606, (2007).
- Marcinkowska, J. 1995. "Nowoczesne spojrzenie na systematykę rodzaju *Phoma*", *Wiad. Bot.*, 39, 47-52.
- Marsilio, A.J., Campestre, V., Lanza, B.C., De Angelis, M. 2001. "Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable for table olive purposes, *Food Chemistry*, 72, 485-490.
- McClary, D.O., Nulty, W.L., Miller, G.R. 1959. "Effect of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*", *Journal of Bacteriology*, 78, 362-368.
- Menz G., Vriesekoop, F. 2010. "Physical and chemical changes during the maturation of Gordal Sevillana olives (*Olea europaea* L., cv. Gordal Sevillana)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4934-4938.
- Morello, J.R., Romero, M.P., Motilva, M.J. 2004. "Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6002-6009.
- Morello, J.R., Vuorela, S., Romero, M.P., Motilva, M.J., Heinonen, M. 2005. "Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2002-2008.
- Mouchacca, J. 2000. "Thermotolerant fungi erroneously reported in applied research work as possessing thermophilic attributes", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 869-880.
- Nergiz, C., Engez, Y. 2000. "Compositional variation of olive fruit during ripening", *Food Chemistry*, 69, 55-59.
- 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 in the cover brine", *Letters of Applied Microbiology*, 34, 173-177.
- Ocakoglu, D., Tokatli, F., Ozen, B., Korel, F. 2009. "Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years", *Food Chemistry*, 113, 401-410.
- Öztürk, F., Yalçın, M., Dıraman, H. 2009. "Zeytinyağı ekonomisine genel bir bakış", *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4, 35-51.
- Panagou, E.Z. 2006. "Greek dry-salted olives: monitoring the dry salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20C", *LWT-Food Science and Technology*, 39, 322-29, (2006).

- Pedras, M.S.C., Chumala, P.B. 2005. "Phomapyrones from blackleg causing phytopathogenic fungi: isolation, structure determination, biosyntheses and biological activity", *Phytochemistry*, 66, 81-87.
- Pitt, J.I. 2000. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species* (3rd ed.). Australia: Food Science Australia, (2000).
- Rapper, K.B., Fennell D.I. 1977. *The Genus Aspergillus*. New York: Krieger Publishing Company.
- Rigane, G., Salem, R.R., Sayadi, S., Bouaziz, M. 2011. "Phenolic composition, isolation, and structure of a new deoxyloganic acid derivative from Dhokar and Gemri-Dhokar olive cultivars", *Journal of Food Science*, 76, C965-C973.
- Rigane, G., Ayadi, M., Boukhris, M., Sayadi, S., Bouaziz, M. 2013. "Characterisation and phenolic profiles of two rare olive oils from Southern Tunisia: Dhokar and Gemri-Dhokar cultivars", *Journal of the Science Food and Agriculture*, 93, 527-534.
- Rios, J.J., Gutiérrez-Rosales, F. 2010. "Comparison of methods extracting phenolic compounds from lyophilised and fresh olive pulp", *LWT – Food Science and Technology*, 43, 1285–1288.
- Rooney, A.P., Ward T.J. 2005. "Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm", *Proceedings of National Academy of Science U S A*, 102, 5084-5089.
- Ryan, D., Robards, K. 1998. "Phenolic compounds in olives", *Analyst*, 123, 31R-44R.
- Saija, A., Uccella, N. 2001. "Olive biophenols: Functional effects on human wellbeing", *Trends in Food Science and Technology*, 11, 357-63.
- Samson, R.A., Hoekstra E.S., Oorschot V. 1981. *Introduction to Food Borne Fungi*, Utrecht, the Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, (1981).
- Samson, R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. 2004. *Introduction to Food-and Airborne Fungi*, (7th ed.). Utrecht, the Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Sanchez Hernandez, M.E., Pérez de Algaba, A., Blanco López, M.A., Trapero Casas, A. 1995. "A disease survey of the drying syndrome in new olive tree plantations in Southern Spain", *Olea*, 23, 114.
- Schipper, M.A.A. 1978. *Studies in Mycology No.25*. Amsterdam: Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters.
- Shephard, G.S., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Vleggaar, R., Marasas, W.F.O. 1991. "Reversed-phase high-performance liquid chromatography of tenuazonic acid and related tetramic acids", *Journal of Chromatography*, 566, 195-205.
- Tanılgan, K., Özcan, M. M., Ünver, A. 2007. "Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europaeae* L.) varieties and their oils", *Grasas Y Aceites*, 58, 142-7.

- Uylaşer, V., Tamer, C.E., İncedayı, B., Vural, H., Çopur, Ö.U. "The quantitative analysis of some quality criteria of Gemlik variety olives", *Journal of Food and Agriculture and Environment*, 6, 26-30, (2008).
- Yorulmaz, A.E., Poyrazoglu, S., Ozcan M.M., Tekin A. 2012. "Phenolic profiles of Turkish olives and olive oils", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 1083-1093.
- White, J.F., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Pp. 315-322. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Eds: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Snisky, J.J., White, J.F. PCR Protocols. San Diego: Academic Press.
- Woudenberg, J.H.C., Aveskamp M.M., de Gruyte, J., Spiers A.G., Crous P.W. 2009. "Multiple *Didymella teleomorphs* are linked to the *Phoma clematidina* morphotype", *Persoonia*, 22, 56-62.
- Zimowska, B., Machowicz-Stefaniak, Z. 2005. "Charakterystyka izolatów *Phoma strasseri* nie notowanego w Polsce patogenu miğty pieprzowej (*Mentha piperita* L.)", *Acta Agrobot*, 58, 151-162.
- Zoidou, E., Melliou, E., Gikas, E., Tsarbopoulos, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L. 2010. "Identification of Throuba Thassos, a traditional Greek table olive variety, as a nutritional source of oleuropein", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 46-50.