



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**SOFRALIK SİYAH ZEYTİN İŞLEME  
SÜRECİNDE MİKOTOKSİK FUNGAL  
TÜRLERİN MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU VE TOKSİN  
OLUŞTURMA POTANSİYELLERİ**

**Nisa ÖZSOY**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**ÇANAKKALE**

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**DOKTORA TEZİ**

**SOFRALIK SİYAH ZEYTİN İŞLEME SÜRECİNDE  
MİKOTOKSİK FUNGAL TÜRLERİN MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU VE TOKSİN OLUŞTURMA  
POTANSİYELLERİ**

**Nisa ÖZSOY**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih: 07/01/2019**

**Tez Danışmanı:**

**Doç. Dr. Çiğdem UYSAL PALA**

**İkinci Danışman:**

**Dr. Öğr. Üyesi Hilal ÖZKILINÇ**

**ÇANAKKALE**

Nisa ÖZSOY tarafından Doç. Dr. Çiğdem UYSAL PALA yönetiminde ve Dr. Öğr. Üyesi Hilal ÖZKILINÇ'ın ikinci danışmanlığında hazırlanan ve **07/01/2019** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Sofralık Siyah Zeytin İşleme Sürecinde Mikotoksik Fungal Türlerin Moleküler Karakterizasyonu ve Toksin Oluşturma Potansiyelleri**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

Doç. Dr. Çiğdem PALA

.....

**Başkan**

Prof. Dr. Emin YILMAZ

.....

**Üye**

Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

.....

**Üye**

Doç. Dr. Onur GÜNEŞER

.....

**Üye**

Dr. Öğr. Üyesi Dilek PİRİM

.....

**Üye**

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No: .....

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FDK-2015-453

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Nisa ÖZSOY

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocalarım Doç. Dr. Çiğdem UYSAL PALA ve Dr. Öğr. Üyesi Hilal ÖZKILINÇ'a;

Değerli katkılarından dolayı ve güler yüzlü yaklaşımları ile çalışmam boyunca yardımını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Emin YILMAZ ve Prof. Dr. Yusuf DİLGİN'a;

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Buket AYDENİZ GÜNEŞER, Ünal SEVİNÇ ve Aygül CAN'a;

Laboratuvar imkanlarıyla çalışmama destek olan ÇEVSAM'a;

Hayatım ve çalışmam boyunca fedakarlıkları ile yanımda olan, Babam Nihat ERKAYA, Annem Hülya ERKAYA'a,

Çalışmama gösterdiği anlayış ve sabırdan dolayı, varlığı ile huzur ve güç bulduğum değerli Eşim Güray ÖZSOY'a, oğlum İsmail ÖZSOY'a ve kızım Ayşe ÖZSOY'a;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nisa ÖZSOY  
Çanakkale, Ocak 2019

## SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde oranı
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACN	Asetonitril
AgNO <sub>3</sub>	Gümüş nitrat
AOAC	Analitik Kimyacılar Derneği
ATP	Adenozin Trifosfat
bç	Baz çifti
Ca	Kalsiyum
<i>cal</i>	<i>Calmadulin</i>
CCl <sub>4</sub>	Karbon Tetraklorür
CIT	Sitrinin
CUPRAC	Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite
CYA	Czapek Yeast Extract Agar
dak	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	Deoksinükleosid trifosfat
DPPH	$\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrylhydrazyl serbest radikal yöntemi
DRBC	Dicloran Rose Bengal Cloramphenicol
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
Fe	Demir
Ha	Hektar
HCl	Hidroksiklorik Asit
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfirik Asit
g	Gram
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu
IOC	Uluslararası Zeytin konseyi
ITS	İnternal Ara Bölgeler
K	Potasyum
kb	Kilo baz

KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram
kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
M	Molarite
m	Metre
MeOH	Metanol
mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
Mon K	Monakolin K
MRS	Man Rogasa Sharpe
N	Normalite
NaCl	Sodyum klorür
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
Nj	Komşu Birleştirme (Neighbor joining)
nm	Nanometre
OTA	Okratoksin A
PCA	Plata Count Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
pks	Poliketit Sentaz
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ppm	Milyonda bir birim
ppb	Milyarda bir birim
R	Regresyon

RNA	Ribo Nükleik asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SAS	İstatistiksel Analiz Yazılımı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
sn	Saniye
TE	Troloks Eşdeğeri
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
TMC	Toplam Mezofilik Canlı
TPC	Toplam Fenol Miktarı
tRNA	Transfer Ribo Nükleik asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UK	Britanya Birleşik Krallığı
UV	Ultraviole
UZZK	Ulusal Zeytin ve Zeytinyağı Konseyi
YE	Yeast Extact
ZAE	Zeytin Araştırma Enstitüsü
Zn	Çinko
<i>β-tub</i>	<i>Beta-Tubulin</i>



## ÖZET

# SOFRALIK SIYAH ZEYTİN İŞLEME SÜRECİNDE MİKOTOKSİK FUNGAL TÜRLEİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE TOKSİN OLUŞTURMA POTANSİYELLERİ

Nisa ÖZSOY

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Çiğdem UYSAL PALA

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hilal ÖZKILINÇ

07/01/2019, 103

Bu çalışmada, Çanakkale il sınırları içerisinde yetişen siyah zeytinlerden üretilen doğal fermente siyah sofralık zeytinin tarladan tüketime kadar geçen işleme sürecinden ve il sınırı içerisinde faaliyet gösteren işletmelerden alınan örneklerden tespit edilen mikotoksik fungal türlerin moleküler tür tayini yapılmış ve toksin oluşturma potansiyelleri belirlenmiştir. Toplamda 130 izolat olmak üzere 57 izolat tarla örneklemeinden, 56 izolat laboratuvar koşullarında üretimi yapılan sofralık zeytinin fermentasyon sürecinden ve 17 izolat ticari işletme örneklemeinden elde edilmiştir. *Beta-tubulin* primeri ile yapılan moleküler karakterizasyonda, bu izolatların 41'i *Alternaria*, 43'ü *Penicillium*, 19'u *Aspergillus*, 8'i *Monascus* and 19'u diğer bazı türler olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan türlerin dağılımı, tarla örneklemeinden fermentasyon boyunca değişim göstermiştir. Ayrıca, tanımlanan türler arasında *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* ve *Monascus pilosus* gibi okratoksin A (OTA) yada sitrinin (CIT) üretiminden sorumlu olabilen fungal türler bulunmaktadır. Çalışmanın devamında, toksin üretiminden sorumlu genlerin varlığı sentezlenen 3 primer seti ile araştırılmıştır. Ayrıca, toksin üretme potansiyeline sahip olan fungal izolatların *in vitro* ortamda toksin üretilip üretilmedikleri kromatografik (HPLC) toksin analizi yapılarak kontrol edilmiş ve izolatların 13'ünün toksin ürettiği tespit edilmiştir. Laboratuvar ortamında üretilen doğal fermente siyah sofralık zeytinin, fermentasyon sürecinde OTA ve CIT varlığına rastlanmamıştır. Fermentasyon boyunca izlenen mikrobiyolojik ve kimyasal parametreler ise beklenen değişimleri göstermiştir. Fermentasyon sürecinde zeytin danesinin toplam fenol miktarı yaklaşık %54 oranında

anlamalı bir azalış gösterirken ( $P<0,05$ ), zeytine özgü başlıca fenolik bileşenlerden hidroksitirozol, tirozol, oleuropein, rutin, vanilin ve apigenin-7-glikozitin miktarsal değişimleri de belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, Çanakkale ilindeki zeytinlerde toksin üretme potansiyeline sahip fungal türlerin tarladan tüketime kadar olan aşamalarda bulunduğu fakat bu fungal türlerin sofralık zeytin fermentasyonu sırasında toksin üretmediği belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Zeytin, Mikotoksin, Okratoksin A, Sitrinin, Moleküler Tür Teşhisi



## ABSTRACT

### MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MYCOTOXIGENIC FUNGAL SPECIES AND THEIR TOXIN PRODUCING POTENTIAL DURING TABLE BLACK OLIVE PROCESSING

Nisa ÖZSOY

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Food Engineering

Advisor: Assoc. Prof. Çiğdem PALA

Co-Advisor: Dr. Lecturer Hilal ÖZKILINÇ

07/01/2019, 103

In this study, molecular markers were used to determine fungal flora in black olive fruits grown in Çanakkale province from field surveys to the table, following the fermentation process including lab-scale and industrial-scale and then, toxin-producing potential were investigated. 57 isolates from field samples, 56 isolates from the fermentation process and 17 isolates from commercial products were collected in total 130 isolates. Among these isolates, 41 *Alternaria*, 43 *Penicillium*, 19 *Aspergillus*, 8 *Monascus* and 19 other genera were determined using amplified sizes of the *Beta-tubulin* region. The occurrence and prevalence of fungal species changed in fungal collections from the field and the fermentation process. Many of these identified species, such as *P. expansum*, *A. niger*, and *M. pilosus*, which are known potential mycotoxin producers, were found both in natural samples as well as fermented samples, even at the end of the fermentation process. Further, three primer pairs were synthesized to determined DNA region related with whether or not have the potential to produce ochratoxin A (OTA) and citrinin (CIT). Besides, these fungal isolates were checked if they produce the toxins *in vitro* and toxin analysis by HPLC presented that 13 of the isolates were able to produce toxin. OTA and CIT toxins were not detected in the black table olives produced. The microbiological and chemical properties showed some changes during fermentation. The total phenolic content of olive fruits significantly decreased about 54% during the fermentation process ( $P<0.05$ ), and the individual changes in oleuropein, hydroxytyrosol, tyrosol, vanillin, rutin, and apigenin-7-glucoside contents of olive fruits were also determined. These results showed

that some critical fungal species are potential toxin producers for OTA and CIT, and these species survive on olives from the field to the table. However, they could not produce these toxins during table olive fermentation process.

**Keywords:** Olive, Mycotoxin, Ochratoxin A, Citrinin, Molecular Species Identification



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
ÖZET .....	viii
ABSTRACT.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	4
2.1. Zeytin .....	4
2.1.1. Zeytin Meyvesi ve Ağacı .....	4
2.1.2. Sofralık Zeytin Üretim Yöntemleri .....	6
2.1.2.1. Sofralık Siyah Zeytin Üretim Yöntemleri .....	6
2.1.2.2. Sofralık Yeşil Zeytin Üretim Yöntemleri .....	7
2.1.2.3. Sofralık Zeytinlerde Kefekte Oluşumu .....	7
2.1.3. Dünya'da ve Ülkemizde Sofralık Zeytin Üretimi.....	8
2.1.4. Sofralık Zeytinin Genel Özellikleri .....	9
2.1.4.1. Mikrobiyolojik Özellikleri.....	9
2.1.4.2. Kimyasal Özellikleri .....	10
2.2. Mikotoksin Üreten Funguslar ve Mikotoksinler .....	11
2.2.1. Gıda Maddelerinde Mikotoksin Sorunu .....	17
2.2.2. Zeytinde Fungal Flora ve Mikotoksin Varlığı .....	18
2.3. Moleküler Biyoloji Teknikleri ve Kullanımı .....	20
2.3.1. Moleküler Teknikler ile Fungal Türlerin ve Toksinlerin Belirlenmesi .....	20
2.3.2. Moleküler Yöntemlerin Gıda Mühendisliğinde Kullanımı .....	22
2.3.2.1. Sofralık Zeytin Mikroflorası ile İlgili Moleküler Çalışmalar .....	23
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal .....	25
3.2. Yöntem.....	25

3.2.1. Deneme Planı .....	25
3.2.1.1. Tarla Örneklemeesi.....	26
3.2.1.2. Doğal Fermente Sofralık Tip Siyah Zeytin Üretimi .....	29
3.2.2. Fungal İzolatların Eldesi ve PZR Temelli Moleküler Tanımlama .....	30
3.2.2.1. Fungal İzolasyonlar ve DNA Ekstraksiyonu .....	30
3.2.2.2. Moleküler Tanımlama.....	31
3.2.2.3. OTA ve CIT Genlerinin Tespiti.....	33
3.2.2.4. Fungal İzolatların Genetik Yakınlıklarının Belirlenmesi .....	35
3.2.3. Kimyasal Analizler .....	35
3.2.3.1. pH Tayini .....	35
3.2.3.2. Titrasyon Asitliği .....	35
3.2.3.3. Tuz Tayini.....	35
3.2.3.4. Toplam Fenolik Madde Analizi.....	36
3.2.3.5. Fenolik Bileşen Profil Analizi .....	37
3.2.3.6. Antioksidan Analizi (CUPRAC Metodu).....	39
3.2.4. Mikrobiyolojik Analizler .....	40
3.2.4.1. Toplam Canlı Sayımı .....	40
3.2.4.2. Laktik Asit Bakteri Sayımı .....	40
3.2.4.3. Küf Sayımı.....	40
3.2.5. Toksin (OTA ve CIT) Analizi .....	40
3.2.5.1. Ekstraksiyon.....	40
3.2.5.2. HPLC Analizi .....	42
3.2.6. İstatistiksel Analiz .....	43
<b>BÖLÜM 4</b>	
<b>ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>44</b>
4.1. Tarladan Sofraya Fungal Türlerin Moleküler Tanımlanması.....	44
4.1.1. Moleküler Tanımlama .....	44
4.1.2. Tarla Örneklemesinden Elde Edilen Fungal Flora .....	47
4.1.3. Laboratuvar Ölçekli Sofralık Zeytin Üretiminden İzole Edilen Fungal Flora ..	50
4.2. Fungal İzolatların Toksin Üretme Potansiyelleri .....	52
4.2.1. Primer Tasarımı ve Fungal İzolatların Toksin Üretimi ile ilgili DNA Bölgelerinin Çoğaltılması.....	52
4.2.1.1. Multiplex PZR Reaksiyonu .....	59
4.3. İzolatların Toksin Üretimi ve Zeytin Fermentasyon Sürecinde Toksin Varlığı .....	60

4.3.1. Kültür Ortamından ( <i>in vitro</i> ) Toksin Analizi.....	60
4.3.2. Fermantasyon Ortamından ( <i>in vivo</i> ) Toksin Analizi.....	63
4.4. Toksin Oluşturan İzolatların Genetik Benzerlikleri .....	64
4.5. Sofralık Siyah Zeytin Üretim Sürecinde Mikrobiyal Yük ve Kimyasal Parametrelerdeki Değişimler.....	66
4.5.1. Mikrobiyal Yük .....	66
4.5.2. Kimyasal Özellikler .....	69
4.6. Sofralık Siyah Zeytin Üretim Sürecinde Biyoaktif Bileşenlerdeki Değişimler .....	72
BÖLÜM 5	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	77
KAYNAKLAR .....	81
EKLERİ.....	I
EK 1. YES agar toksin analizi (OTA) kromotogram görüntüsü.....	II
EK 2: YES agar toksin analizi (CIT) kromotogram görüntüsü.....	III
EK 3: Okratoksin standardı ile kontamine edilmiş YES agar ortamında geliştirilmiş HPLC kromotogramı.....	IV
EK 4: CIT standardı ile kontamine edilmiş YES agar ortamında geliştirilmiş HPLC kromotogramı.....	V
EK 5: Zeytinde toksin analizi kromotogram görüntüsü.....	VI
EK 6: OTA ve CIT standardı ile kontamine edilmiş zeytin ekstraksiyonunun HPLC kromotogramı.....	VII
EK 7: OTA standardı ile kontamine edilmiş zeytin ekstraksiyonunun HPLC kromotogramı.....	VIII
EK 8: CIT standardı ile kontamine edilmiş zeytin ekstraksiyonunun HPLC kromotogramı.....	IX
EK 9: Sekans analizi ile tanımlanan türlerin baz dizilimleri.....	X
ÖZGEÇMİŞ .....	XIV

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Zeytin ağacı .....	4
Şekil 2.2. Zeytin meyvesinin kısımları .....	5
Şekil 2.3. Doğal fermente sofralık zeytin üretimi sırasında oluşan kefekenin SEM'de görüntüsü.....	8
Şekil 2.4. Toksin üretimden sorumlu olduğu bilinen bazı fungal türlerin PDA agar ortamında petri görüntüleri .....	13
Şekil 2.5. CIT ve OTA'nın ve kimyasal formülü .....	16
Şekil 3.1. Deneme planı .....	26
Şekil 3.2. Tarla örneklemesinde alınan zeytin daneleri .....	29
Şekil 3.3. PDA besiyerinde gelişen fungal materyal .....	30
Şekil 3.4. Zeytin örneklerinden elde edilen fungal izolatların petri ve mikroskop görüntüleri.....	31
Şekil 3.5. Sekans verilerinin Bioedit v7.0.53 programından kısmi örnek görüntüsü .....	33
Şekil 3.6. 1. gün (A) ve 240. gün (B) fermentasyonda zeytin danesinin fenolik danesinin fenolik kompozisyonuna ilişkin kromatogramlar .....	38
Şekil 3.7. Toksin ekstraksiyonunda oluşan toksin fazının görüntüsü.....	41
Şekil 3.8. YES agarda gelişen fungal izolatlar .....	42
Şekil 3.9. OTA standart eğrisi ve regresyon eşitliği .....	43
Şekil 3.10. CIT standart eğrisi ve regresyon eşitliği .....	43
Şekil 4.1. <i>Alternaria</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> ve <i>Monascus</i> fungal türlerin $\beta$ -tubulin primeri ile PZR ürün görüntüleri .....	45
Şekil 4.2. <i>Penicillium</i> izolatları için <i>PE_cit</i> primeri ile çalıştırılan PZR reaksiyonunun %2,5 agaroz jelde elektroforez görüntüsü .....	54
Şekil 4.3. Tasarlanan primerlerin PZR reaksiyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri...58	
Şekil 4.4. Multiplex PZR reaksiyonunun elektroforez görüntüsü .....	59
Şekil 4.5. Toksin üreten izolatların genetik benzerlik dendogramı ve Bootstrop değerleri 65	
Şekil 4.6. Zeytinin fermentasyonu sürecinde mikrobiyal değişimi .....	68



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Ülkelerin zeytin üretim alanları ve miktarları .....	8
Çizelge 2.2. OTA ve CIT üreten <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> ve <i>Monascus</i> fungusları ve gıda kaynakları.....	13
Çizelge 2.3. Türk Gıda Kodeksi bulaşanlar yönetmeliği, OTA maksimum limitleri.....	15
Çizelge 2.4. Zeytinde OTA sorunu ile ilgili yapılmış çalışmalar ve elde edilen sonuçlar ..	19
Çizelge 3.1. Tarla örneklemesine ait bilgiler .....	28
Çizelge 3.2. <i>ITS (Internal transcribed spacer)</i> ve <i>β-tubulin (Beta-tubulin)</i> primer çiftlerinin baz dizilimi.....	32
Çizelge 3.3. Primer sentezlenmesi için kullanılan gen bölgesinin "Erişim Numarası" ve ürün baz büyüklüğü.....	34
Çizelge 3.4. Fenolik madde profil analiz metodunda kullanılan gradient programı .....	37
Çizelge 3.5. Fenolik madde profil analiz metoduna ait alıkonma zamanı, konsantrasyon aralığı ve regresyon eşitliği.....	39
Çizelge 4.1. <i>β-tub</i> primeri ile elde edilen sekans verilerine göre tanımlanan fungal izolatların NCBI gen bankası ile uyumu.....	46
Çizelge 4.2. Moleküler tanımlamada elde edilen fungal türler ve izole edilme sıklıkları ...	49
Çizelge 4.3. Sentezlenen primerlerin PZR reaksiyonlarının sonuçlarının listesi .....	55
Çizelge 4.4. <i>In vitro</i> ortamda toksin analizi sonuçları .....	62
Çizelge 4.5. Doğal fermente siyah zeytinin fermentasyon süresinde zeytin danesinde ve salamuradaki kimyasal değişimleri.....	69
Çizelge 4.6. Toplam fenol ve antioksidan aktivite değerleri .....	72
Çizelge 4.7. Zeytin danesi ve salamuranın fermentasyon sürecinde fenolik profilindeki değişim.....	75

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Zeytin ağacı (*Olea europaea L.*), *Oleaceae* familyasının bir üyesi olarak bilinen en eski kültür bitkilerinden birisidir. Zeytin ağacı, sofralık zeytin ve zeytinyağı üretimi amacıyla yetiştirilmekte olup Akdeniz tipi beslenme kültüründe önemli bir yere sahiptir (Talhaoui ve ark., 2015). Zeytin meyvesi, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antikanserojen ve antioksidan özellikler gibi çok çeşitli pozitif sağlık etkilerinden dolayı fonksiyonel bir gıda olarak tanımlanır (Marsilio, 2001; Şahin ve ark., 2010). Zeytin danesinin bileşiminde başlıca %50-75 su, %10-30 yağ, %1-3 protein, %1-4 lif, %2-6 indirgen şeker, %1-3 polifenol bulunmaktadır (Garrido Fernandez ve ark., 1997; Tetik, 2005; Susamcı ve ark., 2011). Yüksek yağ oranı ve acı tadı nedeniyle diğer meyvelerden farklıdır. Taze zeytin meyvesinde bulunan başlıca fenolik bileşen ise sekoiridoid sınıfı oleuropeindir. Oleuropeinin zeytin meyvesindeki acı tatdan sorumlu olması sebebi ile sofralık zeytin üretim sürecinde uzaklaştırılması hedeflenir. Uzaklaştırma işlemi de genellikle salamurada (tuzlu su) bekletme ya da alkali hidrolizi ile sağlanır (Charoenprasert ve Mitchell, 2012). Oleuropeinin, başlıca hidroliz ürünleri ise hidroksitirozol ve elenolik asittir (Araujo ve ark. 2015). Zeytinin sağlığa yararının önemli bir bölümü hidroksitirozol içeriği ile ilişkilendirilmektedir (Charoenprasert ve Mitchell, 2012). Hidroksitirozol, orto-difenolik yapısı nedeniyle antioksidan olarak oldukça aktif bir fenolik bileşen olup (Visioli ve ark., 1998), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) molekülleri üzerinde lipit peroksidasyonunun inhibisyonunu sağlayarak kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir (Vazquez-Velasco ve ark., 2011).

Tarımsal ekonominin değerli bir ürünü olan zeytin ağacının sayısı, dünya genelinde 900 milyon civarındadır ve bu ağaçların %98'inden fazlası Akdeniz ülkelerinde bulunmaktadır. Yağlık ve sofralık olmak üzere toplamda ~170 milyon zeytin ağacı bulunan Türkiye, zeytin ürünleri üretiminde İspanya, Yunanistan ve İtalya'dan sonra dördüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2014). Zeytin, yıllık ~2 milyon ton üretimi ile Türkiye'nin en önemli tarım ürünlerinden birisidir. Üretilen zeytinlerin 455 bin tonu sofralık zeytin üretiminde kullanılmaktadır (UZZK, 2017). Çanakkale, Türkiye'deki toplam zeytin üretiminin yaklaşık %4,2'sini sağlamaktadır (TUİK, 2013). Dünya genelinde üretilen zeytin meyvesinin yaklaşık %70'i zeytinyağı olarak, %30'u da sofralık zeytin olarak tüketilmektedir. Türkiye, sofralık zeytin tüketiminde ise dünya genelinde ilk sıralarda yer almaktadır. Ülkemizdeki sofralık zeytin üretimi gerçekleştiren işletmelerin çoğu küçük aile

şirketleridir (Özkaya ve ark., 2010). Başlıca siyah ve yeşil sofralık zeytin üretimi olmak üzere 2 farklı üretim tekniği ve kendi içerisinde de farklı uygulamalar mevcuttur (Ünal ve Nergiz, 2003). Doğal fermente sofralık zeytin üretim metodu, siyah zeytin üretiminde en çok kullanılan metottur. Bu yöntemde, zeytin meyveleri, dış kabukları siyah ve meyve eti ise mor renkli olduklarında hasat gerçekleştirilir. Daha sonra % 6-10'luk tuz içeren salamura ile fermente edilir (Aran, 2012).

Sofralık zeytinde en sık görülen fungal cinsler, *Penicillium* cinsine aitken, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Rhizopus*, *Alternaria* ve *Paecilomyces* zeytinde bulunan diğer fungal cinslerdir (Şahin ve Korukoğlu, 2000). Funguslar, zeytin meyvesine fermentasyon prosesi öncesi tarladan gelebileceği gibi üretim sırasında da kontaminasyon gerçekleşebilir. Diğer yandan, bu funguslar fermentasyon boyunca canlılığını koruyabilir hatta çoğalabilirler. Bu fungus türlerinden bazıları, insan sağlığına zararlı olan mikotoksin üretebilir. Mikotoksinler funguslar tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Potansiyel olarak toksin ürettiği bilinen en az 350 fungal tür bulunmaktadır (Saldamlı, 2001). Mikotoksinlerin birçoğunun, insanlar ve hayvanların metabolizmalarında kanserojen, nefrotoksik, hepatoksik etki gösterdiği ve dolayısıyla hem bağışıklık sisteminde hem de iç organlarda çeşitli zararlara sebep olduğu bilinmektedir (Kabak ve Var, 2006; Saldamlı, 2001). Mikotoksin üreten türlerin çoğunun *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* ve *Fusarium* gibi fungal cinslere ait olduğu bilinmektedir (Niessen, 2007). Türkiye mikroflorasına ait fungusların sistematik dağılımı %65 *Penicillium*, %19 *Aspergillus*, %11 *Deuteromyces*, %2 *Fusarium*, %2 *Zygomycetes* ve %1 *Basidiomycetes* şeklinde belirtilmiştir (Topal, 2003). Buradan, toksin üretiminden sorumlu en önemli iki fungal tür olan *Penicillium* ve *Aspergillus* toplamda yaklaşık %84 bulunma oranına sahip olduğu görülmektedir. Bu durum mikotoksinlerin ülke ekonomisi ve halk sağlığı açısından ne derece önemli bir tehdit olduğunu göstermektedir.

Okratoksin A (OTA), ilk olarak *Aspergillus ochraceus*'dan izole edilen, fenilalanine bağlı bir dihidrometil-izokoumarin'den türetilmiş poliketitten oluşan metabolit olarak tanımlanmaktadır (Van der Merwe ve ark., 1965; Scott ve ark., 1972; Cabanes ve ark., 2013). Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC) tarafından muhtemel kanserojen olarak tanımlanan OTA, yaygın olarak arpa, yulaf, pirinç ve mısır gibi hububat ürünlerinde nadiren de fasulye, incir, kuru üzüm, kabuklu yemişler, baharatlar, kahve, zeytin ve greyfurt suyunda bulunabilmektedir (Girgin ve ark., 2001; Munoz ve ark., 2011; IARC, 2018).

Monosidin A olarak da bilinen sitrinin (CIT), nefrotoksik ve immunotoksik etkiye sahip bir mikotoksindir (Oruç, 2006; Hong ve ark., 2011). Bulunduğu gıdalar açısından OTA ile benzerlik gösteren CIT'e tahıl grubu gıdalarda, kavrulmuş kuruyemişlerde, ayçekirdeği, siyah zeytin ve meyve sularında rastlanmaktadır (Ostry ve ark., 2013).

Moleküler teknikler, geleneksel yaklaşımlara göre fungal türlerin daha hızlı ve daha doğru teşhisini sağlar. Ribozomal DNA bölgesi, bazı protein kodlayan bölgeler (*kalmodulin*, *β-tubulin*) ve translasyon uzama faktörü gibi, fungusların sistematüğinde sıklıkla kullanılmaktadır (Carbone ve Kohn, 1999; Russell ve Peterson, 2006; Gonvances ve ark., 2012; Tekeoğlu ve ark., 2017). *β-tub* bölgesi için geliştirilen primer çifti farklı fungal türlerin tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Glass ve Donaldson, 1995). Gıda mühendisliğı alanında moleküler tekniklerin kullanımı da yaygınlık kazanmaktadır. Kahve çekirdeğı, mısır ve üzüm gibi birçok gıdada, fungal floranın tanımlanması ve çeşitliliğın belirlenmesi amacıyla moleküler yöntemler kullanılmıştır (Magnani ve ark., 2005; Lumi ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015). Sofralık zeytinler ile ilgili çalışmalarda da moleküler tekniklerin kullanılması söz konusudur. Örneğın, Arroyo-López ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada sofralık zeytinlerdeki mayalar moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, genel olarak Çanakkale ilinde katma değeri yüksek önemli bir ticari ürün olan sofralık siyah zeytinin üretim sürecinde tarladan sofraya sorun oluşturma potansiyeli bulunan mikotoksik fungal türlerin moleküler tekniklerle tanımlanması ve toksin oluşturma potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç kapsamında:

1. Çanakkale ili ve çevresinde yetişen siyah zeytinlere ait fungal floranın moleküler yöntemlerle tanımlanması,
2. Çanakkale ili ve çevresinde yetişen siyah zeytinlerden üretilen doğal fermente siyah zeytinin üretim sürecinde mikotoksin (okratoksin A ve sitrinin) üretim yeteneğine sahip fungal floranın moleküler yöntemlerle tanımlanması,
3. Zeytin fermentasyon sürecinde ve tanımlamalar sonucunda toksin oluşturma potansiyeline sahip olan izolatların *in vitro* koşullarda HPLC ile toksin oluşturma potansiyellerinin ortaya konması,
4. Genetik tanımlama yapılmasının ardından belirlenen OTA ve CIT toksinlerini üreten izolatların genetik benzerliklerinin incelenmesi
5. Zeytin fermantasyonu sürecinde gerçekleşen kimyasal kalite kriterlerindeki değişimler ile birlikte zeytin ve kara su arasındaki biyoaktif bileşen dağılım dinamiğinin ortaya konması hedeflenmiştir.

## BÖLÜM 2

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Zeytin

##### 2.1.1. Zeytin Ağacı ve Meyvesi

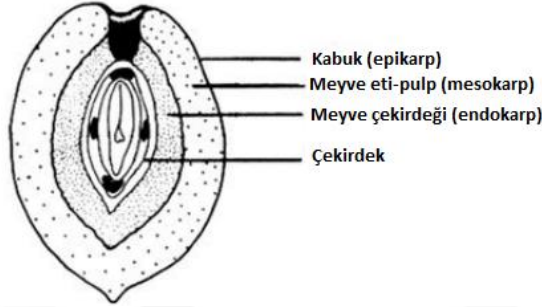
Zeytin ağacı (*Olea europaea* L), dünyanın ılıman ve tropikal bölgelerinde dağılım gösteren ~25 cins ve 600 türden oluşan orta ölçekli *Oleaceae* familyasının bir üyesidir. (Rapoport ve ark., 2016). Bilinen en eski bitki türlerinden birisi olan zeytin ağacı dünya genelinde 8 milyon hektar alana yayılmıştır. Bu alanların %98'i Akdeniz havzasında bulunmaktadır (Talhaoui ve ark., 2015). Zeytin, orta büyüklükte (3-5 m) ve her mevsim yeşil olan bir ağaçtır. Çok sayıda yabani ve kültüre alınmış formları bulunmaktadır (Rapoport ve ark., 2016).



Şekil 2.1. Zeytin ağacı

Zeytin ağacının meyvesi, besleyici değeri çok yüksek önemli bir gıda hammaddesidir. Ağırlığı tipine göre 2-12 g arası değişen zeytin danesinin anatomik yapısı Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Epikarp tabakası, meyvenin kabuk kısmını oluşturmakta olup mumsu bir tabaka ile kaplıdır. Mezokarp kısmı ise meyvenin kuru ağırlıkça %60-85'ini oluşturan pulp (meyve eti) kısmıdır. Odunsu olan endokarp tabakası, meyve ağırlığının %10-30'unu kapsamakta ve çekirdeği çevrelemektedir. Meyvenin kabuk kısmını oluşturan epikarp (%1-2) ise meyvenin renginden sorumlu klorofiller, karotenoidler ve antosiyaninleri içermektedir. Çekirdek kısmı ise meyvenin %2-6'lık kısmını oluşturmaktadır (Saygın Gümüşkesen ve Yemişçiöğlü, 2010; Braadbaart, 2016). Zeytin

danesinin kimyasal bileşimi çeşit, iklim ve yetiştiği toprak gibi farklı nedenlerle miktarları değişiklik gösterse de, genel olarak %50-75 su, %10-30 yağ, %1-3 ham protein, %1-4 lif, %2-6 indirgen şeker, %1-3 polifenolik bileşenlerden oluşmaktadır (Garrido Fernandez ve ark., 1997; Tetik, 2005; Susamcı ve ark., 2011).



Şekil 2.2. Zeytin meyvesinin kısımları (Braadbaart, 2016)

Fenolik bileşenler, yapılarındaki en az bir hidroksillenmiş aromatik halka varlığı ile karakterize edilen geniş kapsamlı sekonder bitki metabolitleri olarak tanımlanmaktadır. Fenolik biyoaktiflerin, antimikrobiyal, antioksidan ve antienflamasyon özelliklerinin yanında enzimlerin aktivitesi ve oksidatif stresi modüle etme yetenekleri ile insan sağlığı üzerine pozitif yönde önemli rolleri olduğu bildirilmektedir (Cicerale ve ark., 2010; Charoenprasert ve Mitchell, 2012; Ahmed ve ark., 2014). Zeytin ağacı yaprak ve meyve kısımlarında bulunan başlıca fenolik bileşen sınıfları, fenolik asitler, fenolik alkoller, flavonoidler ve sekoiridoitleri içermektedir (Vinha ve ark., 2005). Meyvede bulunan başlıca fenolik asitler kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit, vanilik asit, kumarik asit, şiringik asit ve verbaskozit'tir. Baskın flavonoidler ise, luteolin-7-glikozit, siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, rutin, apigenin-7-glikozit, kuersetin-3-ramnozit ve luteolin olarak sıralanabilir (Charoenprasert ve Mitchell, 2012). Bunlar arasında siyanidin-3-glikozit ve siyanidin-3-rutinozit, siyah zeytine rengini veren antosiyanin pigmentleridir. Sekoiridoitler ise oleuropein, ligstrozit ve dimetil oleuropein olarak zeytine özgü en baskın fenolik yapılarıdır. Oleuropein, yapısal olarak hidroksitirozol ve elenolik asit'den oluşan bir esterdir. Ligstrozit ise tirozol ve elenolik asitten oluşan bir esterdir. Zeytinde bulunan hidroksitirozol, tirozol ve glikozit formları başlıca fenolik alkollerini oluşturmaktadır (Sivakumar ve ark., 2005; Pereira ve ark., 2006; Charoenprasert ve Mitchell, 2012; Araujo ve ark., 2015).

### **2.1.2. Sofralık Zeytin Üretim Yöntemleri**

Dünya genelinde üretilen zeytin meyvesinin yaklaşık %70'i zeytinyağı olarak, %30'u da sofralık zeytin olarak tüketilmektedir. Özellikle sofralık zeytin tüketiminde Türkiye ilk sıralarda yer almaktadır (Özkaya ve ark., 2010). Yöresel üretim farklılıkları ve zeytin ırkından gelen farklılıklar sebebi ile ülkemizde sofralık zeytin çeşitleri çok fazladır. Başta siyah ve yeşil zeytin üretimi olarak ikiye ayrılan sofralık zeytinlerin kendi içerisinde farklı üretim teknikleri mevcuttur. Üretim yöntemlerindeki farklılık, tüketim öncesindeki sofralık zeytinin özelliklerine etki etmesi bakımından önemlidir. Örneğin, Memecik tipi Kalamata zeytinlerden ve siyah sofralık zeytin tipi zeytinlerde yapılmış bir çalışmada, zeytin hazırlama yöntemleri ve saklama yöntemlerinin zeytinlerin bileşimi ve besleyici değeri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, yeşil zeytin, siyah zeytin ve Kalamata zeytinin fermentasyon süresinde çeşitli kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Sofralık zeytinlerin, suda çözünür bileşen ve minerallerinin (Ca, K, Fe, Zn) başlangıç değerlerine kıyasla işleme ve depolama sırasında etkilendiği sonucuna varılmıştır (Ünal ve Nergiz, 2003).

#### **2.1.2.1. Sofralık Siyah Zeytin Üretim Yöntemleri**

Sofralık siyah zeytin üretiminde en yaygın kullanılan ve çalışmamızda da tercih edilen yöntem "doğal fermente siyah zeytin üretim" tipidir. Ülkemizde tüketilen sofralık siyah zeytinlerin büyük çoğunluğunda bu yöntem kullanıldığından zeytin üretimi açısından önemli bir tekniktir. Gemlik, Edincik, Samanlı, Edremit, Uslu, Kan ve Çelebi gibi hemen hemen tüm zeytin tipleri için uygulanabilen bir tekniktir. Seçme, ayıklama, temizleme, yıkama gibi ön işlemler sonrasında zeytin daneleri %9-10'luk salamurada fermente edilir (Aran, 2012). Fermentasyon sürecinde son tuz oranı %5-7 olacak şekilde ayarlanır. Fermentasyonu tamamlanmış zeytinlerin pH'sı 4,5-4,6 olmalıdır. Fermentasyonu tamamlanan zeytinler ambalajlanarak tüketime sunulur (Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, www.zae.gov.tr).

Siyah sofralık zeytinde en yaygın kullanılan diğer iki yöntem Kalifornia tipi (Ripe Olive) ve Konfit (Fas) üretim yöntemleridir (Tokuşoğlu, 2016). Kalifornia tipi zeytin üretiminde, zeytinler işleme öncesinde NaOH içeren çözeltilerde bekletilir. Takiben, asidik bir yıkama suyu ile acısı alınır ve salamura ile muamele edilir (Charoenprasert ve Mitchell, 2012; Tokuşoğlu, 2016). Konfit tipi üretim yönteminde de acılık, alkali (NaOH çözeltisi) muamele ile giderilir. Kalifornia tipinden farkı, zeytinlerin kızıla ve siyaha dönme aşamasında hasat edilmesi ve acılığın alkali muamele ile tam giderilmeden sonlandırılmasıdır (Tokuşoğlu, 2016).

### 2.1.2.2. Sofralık Yeşil Zeytin Üretim Yöntemleri

Sofralık yeşil zeytin üretiminde, siyah zeytine uygulanandan daha fazla yöntem vardır. Bunlardan en yaygın kullanılanları, Yunan tipi, İspanyol tipi, kırma ve çizme yöntemi ile dolgulu yeşil zeytin üretim prosesleridir (Charoenprasert ve Mitchell, 2012; Tokuşoğlu, 2016). Yunan tipi yeşil zeytin üretimi, yalnızca salamura ve hava oksidasyonu ile fermentasyon ve renk değişiminin sağlandığı yöntemdir. Diğer yöntemlere göre, fermentasyon sürecinde fenoliklerin daha iyi tutunmasını sağlar (Charoenprasert ve Mitchell, 2012).

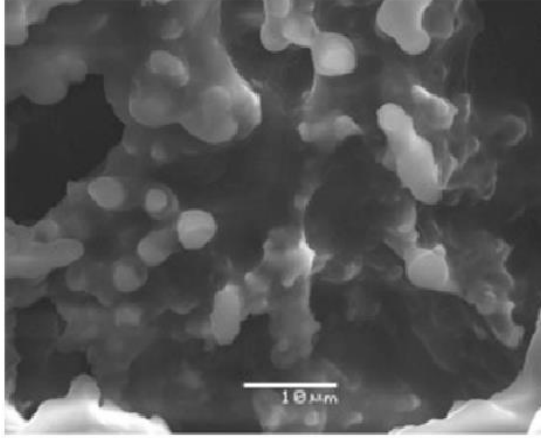
İspanyol tipi zeytin üretiminde, ayıklama ve boylama gibi ön işlemlerden sonra zeytin danesinin 2/3'üne işleyecek kadar alkali muamele yapılır. Takiben, yıkama işlemi ve salamura ile fermentasyon gerçekleştirilir (Aran, 2012; Charoenprasert ve Mitchell, 2012; Tokuşoğlu, 2016). İspanyol tipi zeytin fermentasyonunun temeli NaOH çözeltisi ile oleuropeinin oleoside-11-metilester ve hidroksitirozole parçalanmasıdır (Charoenprasert ve Mitchell, 2012).

Çizme ve kırma zeytin yöntemlerinde, acılığın giderilmesi hariç diğer adımlar İspanyol yöntemi ile aynıdır. Bu yöntemlerde acılığın giderilmesi, çizme zeytin yönteminde zeytin danesi çizme makinasından geçirilerek, kırma yönteminde ise uygun şekilde kırılarak veya iğne ile delinerek salamurada bekletilmesi ile sağlanır. Dalgulu yeşil zeytinde ise fermente olmuş yeşil zeytinlerin çekirdekleri, endüstriyel bir makine ile çıkartılarak, çekirdek yuvasına (biber, badem vs. gibi) istenilen dolgu maddesi yerleştirilmektedir (Tokuşoğlu, 2016).

### 2.1.2.3. Sofralık Zeytinlerde Kefeke Oluşumu

Kefeke, zeytin yüzeyinde oluşan maya ve küf örüntüsüdür (Korukluoğlu ve ark., 2000). Türkiye'de "Kefeke" olarak adlandırılan ve zeytin salamura havuzunda oluşan bu biofilm, paketlenme öncesi de zeytinlerde oluşabilir. Florada *Penicillium* türleri yaygın bulunurken, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Rhizopus*, *Alternaria* ve *Paecilomyces* cinslerine ait türlere de rastlanmaktadır (Şahin ve Korukoğlu, 2000). Söz konusu flora, fermentasyon süreci öncesinde tarladan gelebildiği gibi üretim süreci sırasında da ortaya çıkabilir. Aynı zamanda bu fungal etmenler, ürünün yumuşamasına, kokuşmasına, mikotoksin oluşumuna neden olmakta ve sağlık açısından tehlikeler oluşturmaktadır (Korukluoğlu ve ark., 2000). Şekil 2.4'de laktik asit bakterileri ve mayaların karışık görünümü verilmiştir (Graunta ve ark., 2016).





Şekil 2.3. Doğal fermente sofralık zeytin üretimi sırasında oluşan kefenin SEM'de görüntüsü (Graunta ve ark., 2016)

### 2.1.3. Dünya'da ve Ülkemizde Sofralık Zeytin Üretimi

Ülkemizin önemli tarımsal ürünlerinden olan zeytin, dünya ticaretinde de önemli bir yere sahiptir (Kara ve Özbaş, 2013). Fakat ülkemiz yalnızca üretiminin %17'sini ihraç edebildiği için dünya ihracatında %10'luk bir paya sahiptir (Zorlutuna, 2006). Türkiye'de, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre 2014 yılında 1.768.000 ton zeytin üretimi yapılmıştır. Bunun 400.000 tonu sofralık zeytin üretimi iken 1.280.000 tonu zeytinyağı yapımında kullanılmıştır (TÜİK, 2016). Bununla birlikte son on yılda zeytin üretiminde yaklaşık 2 kat bir artış olmuştur. Sofralık zeytin üretiminin %60'ı Marmara Bölgesi'nde gerçekleştirilmektedir.

Çizelge 2.1. Ülkelerin zeytin üretim alanları ve miktarları (FAO, 2014; Duran ve Ünal,2016)

Ülkelerin Üretim Alanı (ha)	Üretim Alanı (ha)	Üretim (ton)
Dünya	10688626	15999840
İspanya	2515800	4577800
İtalya	1156784	1963676
Yunanistan	945520	2283820
Fas	886440	1191520
Tunus	1588620	376000
Türkiye	938080	1768000

Çanakkale ili, %6,7'lik üretim oranı ile Türkiye'de dane zeytin üretiminin toplam %71,6'sının üretildiği 7 ilimizin içinde 6. sırada yer almaktadır (Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, www.zae.gov.tr). Türkiye'deki zeytin alanlarının %4'ü Çanakkale ilinde bulunmaktadır (Aktaş, 2008). Sofralık zeytin üretiminin büyük bir çoğunluğu küçük aile işletmeleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu durum, standardın oluşmaması ve hijyen sorunları ile karşılaşılmasına neden olmaktadır (Özkaya ve ark., 2010).

#### **2.1.4. Sofralık Zeytinin Genel Özellikleri**

##### **2.1.4.1. Mikrobiyolojik Özellikler**

Aponte ve ark. (2010) tarafından sofralık yeşil zeytin fermantasyonu sırasında mikrobiyolojik, kimyasal ve duyuşsal parametrelerdeki değişimlerin incelendiği bir çalışmada, toplam canlı sayısının ve toplam maya-küf sayısının 2 kob/g'dan 6 kob/g'a kadar arttığı belirtilmektedir. Bu artış, fermentasyonun ortalama 60-70. günlerine kadar devam edip 75. günden sonra çok fazla değişiklik göstermemiştir.

Abriouel ve ark. (2011), geleneksel sofralık yeşil zeytin olan Alorena yeşil zeytininin fermentasyon sürecinde mikrobiyal kalite değişimini gözlemlemiştir. Starter kültür kullanılmadan fermente edilen zeytinlerde mikroflorayı belirleyen faktörlerin, zeytin danesindeki ve teknedeki mikroflora olduğu belirtilmiştir. Fakat, bunun standardizasyonu zorlaştırdığı ve ekonomik kayıpları artırdığı, bu nedenle starter kültür kullanımının yaygınlaştırılması gerektiği bildirilmiştir. Bakteri popülasyonunda ilk iki ayda *Pseudomonas* ve *Sphingomonas cinslerine ait* türler hakim iken, üçüncü aydan sonra *Laktobacillus* ve *Lactococcus cinsleri* hakim mikroflora durumuna geçmektedir. Ayrıca, ortam sıcaklığında, fermentasyonun sonlarına doğru laktik asit bakteri miktarı artarken, soğuk-fermente zeytinlerde fermentasyon sonunda baskın popülasyonun mayalar olduğunu belirtilmiştir.

Papadelli ve ark. (2015) tarafından doğal fermente sofralık siyah zeytinlerin fermantasyonunda starter kültür kullanımının değerlendirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada, iki laktik asit bakterisini (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Lm139 ve *Lactobacillus pentosus* DSM 16366) starter kültür olarak kullanılmıştır. 70 gün izlenen fermentasyonunun laktik asit bakteri sayısı 4-8 kob/g olarak değişim göstermiş ve daha sonraki dönemde 7-8 kob/g olarak stabil kalmıştır. Toplam küf-maya sayısı ise hemen hemen tüm çalışmalarda olduğu gibi 6-7 kob/g olarak stabil kaldığı belirtilmiştir.

#### 2.1.4.2. Kimyasal Özellikler

Zeytin meyvesi, düşük şeker seviyesi, yüksek yağ oranı ve acı tadı ile diğer meyvelerden farklılık göstermektedir (www.zae.gov.tr). Sofralık olarak işlenecek zeytin, biyolojik olarak aktif fenolik bileşikleri (antosiyantinler, flavanoller, fenolik asit ve fenolik alkoller) içermektedir. (Boskou, 2015). Taze zeytin meyvesinde bulunan temel fenolik bileşik ise oleuropeindir. Zeytindeki acı tadın oleuropein içeriğinden kaynaklanması nedeniyle, sofralık zeytin işleme sürecinde bu değerli biyoaktif madde uzaklaştırılmaktadır. Uzaklaştırma işlemi genellikle salamurada bekletme ya da alkali hidrolizi ile sağlanmaktadır. Oleuropeinin temel hidroliz ürünleri ise hidrokstitirozol ve tirozoldür. Zeytin meyvesinin sağlık üzerine olumlu fizyolojik etkisinin önemli bir bölümü hidrokstitirozol içeriği ile ilişkilendirilmektedir (Charoenprasert ve Mitchell, 2012). Zeytin meyvesinin bu olumlu özelliklerinden dolayı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 1 Kasım 2004 tarihinde naturel zeytinyağının sağlığa yararlı etkisinin ambalajlara yazılmasına izin vermiştir (Öztürk ve ark, 2009).

Zeytinde, pH, titrasyon asitliği ve tuz gibi kimyasal özellikler sofralık zeytinin fermentasyon sürecinin başarılı olması, lezzet ve tekstürü açısından önemlidir. pH, fermentasyonun ilk döneminde daha hızlı düşerek sonraki dönemlerinde stabil hale gelmektedir. Örneğin, Bleve ve ark. (2014) Cellina di Nardò ve Leccino sofralık zeytinlerinde yaptığı bir çalışmada pH'nın ilk 5-10 günde hızlı bir şekilde 4,4-4,7'e düştüğü görülmektedir. Tuzluluk ise yaklaşık %10 değerinde stabil kalmaktadır.

Sofralık zeytinlerde fermentasyonu gerçekleştiren mikroorganizmalar yalnızca mikrobiyolojik özellikler üzerine değil kimyasal özellikler üzerine de oldukça etkilidir. Doğal fermentasyon ve starter kültür kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon ile üretilen sofralık zeytinlerin kimyasal özellikleri üzerine literatürde birçok çalışma mevcuttur (Garrido Fernandez ve ark., 1997; Tetik, 2005; Susamcı ve ark., 2011). Zeytin danesinin temel bileşenlerini %50-75 su, %10-30 yağ, %1-3 ham protein, %1-4 lif, %2-6 indirgen şeker, %1-3 polifenolik bileşenlerin oluşturduğu bildirilmiştir (Susamcı ve ark., 2011).

Siyah sofralık zeytinlerde (*Olea europaea L cv. Kalamon*) doğal fermentasyon ve starter kültür kullanımının fiziko-kimyasal özellikler üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, iki farklı starter kültür kullanılarak ve doğal fermentasyonla sofralık zeytin üretilmiştir. Çalışmada, pH ve titrasyon asitliğindeki değişim, doğal fermentasyon ve starter kültür ile yapılan zeytinlerde farklılık gösterdiği belirtilmektedir. Örneğin, titrasyon asitliği starter kültür ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda laktik asit eşdeğeri olarak % 0,60 ile sonlanırken, doğal fermentasyon ile üretilen zeytinde ise % 0,30 düzeyinde

kalmaktadır. pH değeri ise benzer şekilde starter kültür kullanılarak üretilen zeytinlerde 4,0 pH'ya kadar düşerken, doğal fermentasyonda 5,0 pH'da stabil kaldığı bildirilmiştir (Papadelli ve ark., 2015).

Fenolik bileşenler, zeytinin sağlıkla ilişkisinde büyük öneme sahiptir. Literatürde, fenoliklerin miktarları, fermentasyon sürecinde ki değişimleri ve zeytinyağında ki kompozisyon ve miktarları ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Owen ve ark., 2000; McDonald ve ark., 2001; Jerman ve ark., 2010; Romero ve ark., 2013).

Jerman ve ark. (2010), zeytinyağı fenolik bileşiklerinin ultrason yardımıyla katı sıvı özütlemesi ile ilgili bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada, zeytin meyvesinde tanımlanabilen fenolikler, hidrokstirozol glikozit, dimetil oleuropein, oleuropein, verbaskozit, kafeol-60-sekologanozit, kuersitrin, komselozit, luteolin-7-glikozit ve rutin olarak belirtilmiştir.

Romero ve ark. (2013), sofralık siyah zeytin üretiminde fenolik madde profil değişimi üzerine bir çalışma yapmıştır. Başlangıçta zeytindeki polifenoller, hidrokstirozol-4-a-glikozit, oleuropein, hidrokstirozol, tirozol, salidrozin ve verbaskozit olarak belirlenirken, 12 ay sonra ana fenolik bileşen hidrokstirozol olmuştur. Ayrıca, taze zeytinlerde tespit edilen temel antosiyaninler; siyanidin 3-rutinozid ve siyanidin 3-glikozit iken, 1 aylık bir depolama sonrasında salamura veya zeytinyağında bu bileşenlere rastlanamamıştır. Hidrokstirozolün yanında, hidrokstirozol asetat, tirozol ve tirozol asetat nihai (son) ürünün yağ fazında tespit edilen ana polifenollerdir.

McDonald ve ark. (2001), zeytin ekstraktlarının fenolik bileşenleri ve antioksidan aktiviteleri ile ilgili yaptığı bir çalışmada, zeytin fraksiyonlarının çoğunda belirgin antioksidan aktivite görüldüğünü ve bunun fenolik içeriğe bağlı olduğunu bildirmiştir.

## **2.2. Mikotoksin Üreten Funguslar ve Mikotoksinler**

Mikotoksinler, funguslar tarafından üretilen ikincil toksik metabolitlerdir. Yaklaşık 350 farklı fungus tarafından üretilen 400'den fazla mikotoksin bulunmaktadır (Abdel-Hamed ve ark., 2012; Saldamlı, 2001). Mikotoksin üreten türlerin en önemlileri *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* ve *Fusarium* cinslerine ait olanlarıdır (Niessen, 2007).

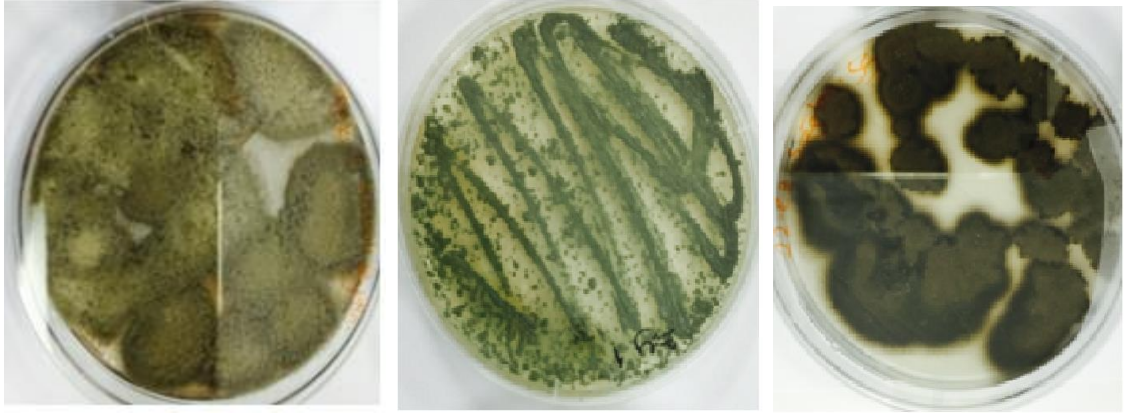
Dünya çapında çok yaygın olan *Alternaria*'nın bir kısmı havada ve diğer habitatlarda saprofit olarak, bir kısmı ise bitki patojeni olarak bulunmaktadır. Hayvan ve insan derisinde bulunabilir. Çok geniş tür sayısına sahip olmakla birlikte tanımlanmaları zordur. Dünya üzerinde yaklaşık 300 türü olduğu bilinmektedir. Bu türlerden bir çoğu toksin üretebilir (Pavon ve ark., 2012a; Pavon ve ark., 2012b). *Alternaria* toksinleri özofegal kanserlerden, çeşitli hastalıklara kadar birçok patolojiyle ilişkilendirilmiştir (Ostry, 2008;

Pavon ve ark., 2012a). *Alternaria* mikotoksinleri, genellikle *Alternaria* yanıklığı ile enfekte olan çiğ ve işlenmiş meyveler, sebzeler (domates ürünleri gibi), zeytinler, turunçgiller ve yağlı tohumlardan izole edilir (Viskonti ve ark., 1986; Ostry, 2008; Pavon ve ark., 2012b). Gıda kaynaklı *Alternaria*'ları tespit etmek için geleneksel yöntem, organizmaları seçici ortamda kültürlenmeyi, saf kültürlerin izolasyonunu, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanmasını içermektedir. Geleneksel yöntem, zaman alan bir yöntemdir (Pavon ve ark., 2012a). Moleküler olarak tanımlanmaları ITS gen bölgesi sekanslamasına dayanmaktadır (Pastor ve Guarro, 2008). Alternariol, alternariol monometil eter, tenuazonik asit ve altenuen en çok bilinen *Alternaria* toksinleridir. Bu mikotoksinlerden alternariol ve alternariol monometil eterin mutajenik etkisi diğerlerinden daha fazla olduğundan daha çok bilinmektedir (Öksüztepe ve Erkan, 2016).

*Penicillium*, *Trichocomaceae* familyasına ait olup yaklaşık 300 türü ile doğada yaygın olarak bulunan ve penisilin gibi önemli bir antibiyotiği üreten türleri içeren fungal cinstir. *Penicillium* türlerine farklı gıdalarda sıklıkla rastlanır ve birçok türünün ikincil metabolit ürettiği bilinmektedir (Kokkonen ve ark, 2005). *Penicillium*'ların OTA üretiminden sorumlu olduğu bilinen başlıca türleri *P. verrucosum* ve *P. nordicum* olmakla birlikte, CIT üretimden sorumlu olduğu bilinen başlıca türleri ise *P. citrinum*, *P.expansum* ve *P. verrucosum*'dir. Bunlardan, *P. verrucosum* daha çok tahıl ürünlerinde, *P. nordicum* ise daha çok salam, jambon gibi et ürünlerinde toksin üreticisi olduğu bilinmektedir (Kokkonen ve ark., 2005; El-Khoury ve Atoui, 2010).

*Aspergillus*, dünya geneline yayılmış, bazısı patojen özelliğine sahip yaklaşık 200 türden oluşan *Moniliaceae* familyasına ait fungal cinstir. Bu fungal cinse ait türler, aflatoksin başta olmak üzere birçok toksinin üretiminden sorumludur. Ürettiği başlıca mikotoksinler aflatoksin, OTA, CIT, patulin, penisilik asit ve sterigmatoksin olarak bilinmektedir (Tunail, 2000). *Aspergillus*'ların OTA üretiminden sorumlu olduğu bilinen başlıca türleri *A. carbonarius* ve *A. niger*'dir. Özellikle *A. carbonarius* türünün izolatların okratoksijenik olma olasılığı yüksektir, hatta bu oran bazen %100'e bile çıkabilmektedir (Cabanes ve ark., 2013; Castella ve ark., 2015). *Aspergillus*ların *Candidus* ise CIT üretme potansiyeli olduğu bilinmektedir (Timonin ve Rauatt, 1944).

*Monascus* türleri, binlerce yıldır özellikle Doğu Asya'da fermente gıdaların üretimde kullanılmaktadır. Mon K, *Monascus* fungal grubundan en çok tespit edilen mikotoksindir. Fakat, gıdalarda kullanımı nefrotoksik ve hepatoksik olarak bilinen CIT nedeniyle kısıtlıdır (Hong ve ark., 2011). *Monascus* türlerinde CIT üretiminden sorumlu *M. purpureus* ve *M. ruber* bilinen başlıca türlerdir (Pisareva ve ark., 2005).



Şekil 2.4. Toksin üretiminden sorumlu olduğu bilinen bazı fungal türlerin PDA agar ortamında petri görüntüleri

Gıdalarda toksin üretiminden sorumlu en yaygın fungal türler, ilişkili gıda kaynakları ve referansları Çizelge 2.2'de özetlenerek verilmiştir.

Çizelge 2.2. OTA ve CIT üreten *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Monascus* fungusları ve gıda kaynakları (Ostry ve ark., 2013)

	Cins	Tür	Potansiyel Gıdalara örnek	Referans
OTA üreten	<i>Aspergillus</i>	<i>A. ochraceus</i>	Üzüm	<i>Pardo ve ark., 2005</i>
		<i>A. steynii</i>	Arpa, Kırmızı biber	<i>Gil-Serna ve ark., 2015</i>
		<i>A. westerdijkiae</i>	Arpa, Kırmızı biber	<i>Gil-Serna ve ark., 2015</i>
		<i>A. carbonarius</i>	Kuru üzüm	<i>Abarca ve ark., 2003</i>
		<i>A. foetidus</i>	Üzüm	<i>Magnoli ve ark., 2003</i>
		<i>A. niger</i>	Yer fıstığı	<i>Astoreca ve ark., 2007</i>
		<i>A. tubingensis</i>	Üzüm	<i>Perrone ve ark., 2006</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i>	Şarap	<i>Cabanes ve ark., 2002</i>
CIT üreten	<i>Penicillium</i>	<i>P. citrinum</i>	Pirinç	<i>Trung ve ark., 2001</i>
		<i>P. expansum</i>	Elma	<i>Abramson ve ark., 2009</i>
	<i>Monascus</i>	<i>M. purpureus</i>	Fermente pirinç	<i>Chen ve ark., 2005</i>

Yukarıda açıklanan fungal türler dışında *Fusarium* başta olmak üzere birçok fungus mikotoksin adı verilen ikincil metabolitlerin üretiminden sorumludur. Toksin üretimden sorumlu olduğu bilinen bazı fungal türlerin laboratuvar ortamında petri görüntüleri Şekil 2.4'de gösterilmektedir. Mikotoksinlerin keşfi ve tanımlanması yakın bir tarihte olduğu için literatürde her geçen gün yeni bir mikotoksin veya mikotoksin üretimden sorumlu fungusun girmesi söz konusudur.

Mikotoksin kavramı ilk defa 1960'larda tespit edilmiştir. İlk tanımlanan ve günümüzde en çok üzerinde durulan mikotoksinlerden bir tanesi aflatoksinidir. 8 çeşidi olan aflatoksinin en yaygını ve toksisitesi en fazla olanı ise aflatoksin B1'dir (Saldamlı, 2001). Bunun dışında, okratoksin, patulin, sterigmatosistin, trikotesenler, zearalenon, sumonisin ve sitrinin önemli mikotoksinlerdendir. Bu mikotoksinlerin birçoğunun, bunları tüketen insanlar ve hayvanların metabolizmalarında kanserojen, nefrotoksik, hepatoksik etki gösterdiği ve gerek bağışıklık sisteminde gerek iç organlarda çeşitli zararlara sebep olduğu bilinmektedir (Kabak ve Var, 2006; Saldamlı, 2001).

Okratoksin, önemli bir mikotoksin grubudur. İlk defa 1965 yılında *Aspergillus ochraceus*'dan izole edilmiştir (Scott ve ark., 1972; Cabanes ve ark., 2013). *Aspergillus ochraceus*'un fenilalanine bağlı bir dihidrometil-izokumarin'den türetilmiş poliketitten oluşan metabolit olarak tanımlanmıştır (Van der Merwe ve ark., 1965; Cabanes ve ark., 2013). Okratoksin A'nın kimyasal formülü, Şekil 2.5'de gösterilmektedir. Nefrotoksik etkisi başta olmak üzere hepatoksik, embriyonik, immunitoksik, teratojenik ve karsinojenik özelliğide bilinmektedir (Pfohl-Leszkowicz ve Manderville, 2007). Toksik etkisi, ATP azalması ile mitokondriyel solunumun inhibisyonu ve protein sentezinin azalması, bunu takiben tRNA sentezinin inhibisyonu ve lipit peroksidasyonunun artması olarak bilinmektedir (Sabuncuoğlu ve ark., 2008). Okratoksin A, okratoksin B ve okratoksin C olmak üzere 3 gruba ayrılır. Fakat, bunların içinde toksisitesi diğerlerinden 10 kat daha fazla olan ve yaygın olarak tespit edilen OTA en önemlisidir. Soğuk iklim gıdalarında daha fazla rastlanılan OTA, 1993 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC, 1993) tarafından grup 2B olarak muhtemel insan karsinojeni olarak tanımlanmıştır (Munoz ve ark., 2011). Okratoksin en fazla arpa, yulaf, pirinç ve mısır gibi hububat ürünlerinde rastlanmaktadır. Bunun yanında fasulye, incir, kuru üzüm, kabuklu yemişler, baharatlar, kahve, zeytin ve greyfurt suyunda da bulunabilmektedir (Girgin ve ark., 2001).

Türk Gıda Kodeksinde, henüz CIT mikotoksini ile ilgili herhangi bir kriter söz konusu değildir. Fakat, OTA ile ilgili kriterler mevcuttur. Yönetmelikte olan kriterler ve

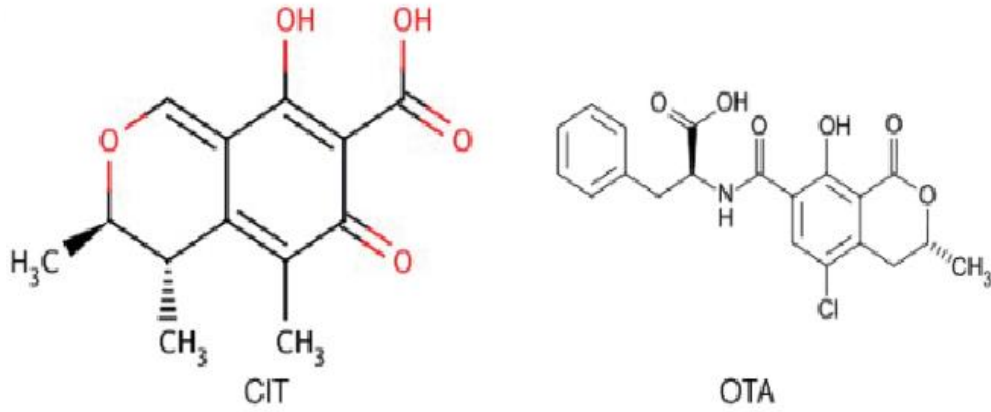
İlgili gıdalar Çizelge 2.3'de gösterilmektedir (Türk Gıda Kodeksi, 2016). Çizelge 2.3'den görüldüğü gibi, zeytin ve zeytinden üretilen ürünlerin okratoksin ve CIT bulaşan miktarı ile ilgili herhangi bir kısıtlama ve kriter söz konusu değildir.

Çizelge 2.3. Türk gıda kodeksi bulaşanlar yönetmeliği, OTA maksimum limitleri (Türk Gıda Kodeksi, 2016)

Gıda	Maksimum limit (µg/kg)
İşlenmemiş gıdalar	5,0
İşlenmemiş tahıllardan elde edilen tüm ürünler	3,0
Kurutulmuş asma meyveleri (Kuş ürümü, kuru üzüm ve Çekirdeksiz üzüm)	10,0
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,0
Kahve ekstraktı, Çözünebilir kahve ekstraktı ve çözünebilir kahve	10,0
Şarap ve meyve şarapları	2,0
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli	2,0
Üzüm suyu, konsantreden elde edilen üzüm suyu, Üzüm nektarı, üzüm şırası ve konsantreden elde edilen üzüm şırası	2,0
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,5
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,5
Baharat çeşitleri	30 (30.06.2012 tarihine kadar)
Kırmızıbiber, karabiber, hintcevizi/muskat, zencefil, zerdeçal, bunların bir veya birkaçını içeren baharat karışımları	15 (1.07.2012 tarihinden sonra)
Meyan kökü	20
Meyan kökü ekstraktı	80



OTA üretiminden sorumlu başlıca fungal türler *P. verrucosum*, *P. nordicum*, *A. carbonarius*, *A. niger* ve *A. ochraceus*'dir. Fakat tüm toksinlerin üretilip üretilmemesinde, sıcaklık ve nem gibi çevre şartları, gıdanın içeriği, bekleme süresi, pH ve ışık gibi faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Filtenborg ve ark., 2000; Kokkonen ve ark, 2005; Munoz ve ark., 2011). Üretimden sorumlu fungal türlerin toksin üretmesindeki önemli faktörlerden biri de gıdanın türüdür. Örneğin, şarap, üzüm ve kurutulmuş asma meyvelerinde en önemli OTA kaynağı *Aspergillus section nigri* iken, tahıl ve depolanmış gıdalarda en önemli OTA kaynağı *Aspergillus vesterdijkiae* ve *Penicillium verrucosum*'dur (Cabanes ve Bragulat, 2008; Castella ve Cabanes, 2011).



Şekil 2.5. CIT ve OTA'nın ve kimyasal formülü (a) CIT (b) OTA (Tokuşoğlu ve ark., 2010)

CIT, OTA kadar yaygın rastlanmasa da toksisitesi yüksek olan mikotoksinlerden bir tanesidir. Monascidin A olarak da bilinir (Hong ve ark., 2011). Sarı kristalin bir madde olan CIT 166-170°C'de erimektedir (Timonin ve Rauatt, 1944). Kimyasal formülü Şekil 2.5'de gösterilmektedir. Nefrotoksik ve immunotoksik etkiye sahiptir (Oruç, 2006). Fakat, 1986 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü deney hayvanları üzerinde CIT'in kanserojen özelliği ile ilgili kısıtlı kanıt olduğu ve insanlar üzerinde karsinojenitesi üzerine bir değerlendirme yapılmadığı bildirilmiştir (Ostry ve ark., 2013). CIT, genellikle OTA ile aynı gıdalarda bulunur. Tahıl grubu gıdalarda, kavrulmuş kuruyemişlerde (badem, fındık, fıstık ve yer fıstığı gibi), ayçekirdeği, siyah zeytin, meyve sularında ve kırmızı mikrofungus olan *Monascus purpureus* ile fermente edilmiş pirinç bazlı gıda takviyelerinde CIT'e rastlanmaktadır (Ostry ve ark., 2013).

### 2.2.1. Gıda Maddelerinde Mikotoksin Sorunu

Gıda maddeleri için önemli olan fungal organizmalar, düşük pH, düşük su aktivitesi ve yüksek basınç gibi koşullarda da üreyebilme yeteneğindedir. Gıda biyoprosesinde, enzimlerin ve gıda katkılarının üretiminde de kullanılabilen funguslar, gıda kaynaklı intoksikasyona neden olabilir (Erkmen, 2011). Gıdalarda kötü koku ve tat oluşumuna neden olabilen funguslar ısıtma, dondurma, antibiyotik ve radyasyon uygulaması gibi koruma ve depolama tekniklerine direnç göstererek mikotoksin oluşturabilirler (Vural ve ark., 2004).

Mikotoksinli gıdanın ve yemin tüketilmesi ya da bu yemle beslenen hayvanın tüketilmesi ile meydana gelen hastalığa "mikotoksikozis" denir (Özkaya ve Cömert, 2008). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 yılı verilerine göre gıdaların özellikle tahıl grubunun %25'inde mikotoksinler oluşmaktadır (FAO, 2004; Moriatti ve ark., 2013). Hem ülke ekonomisi ve uluslararası ticaret hem de insan sağlığını olumsuz etkileyen mikotoksinler yalnızca Amerika'da aflatoksin kaynaklı 1,9 milyar dolar ve *Fusarium* toksinlerinden kaynaklanan 2,9 milyar dolar zararlara neden olmuştur (Moriatti ve ark., 2013).

Hem sağlık hem de ekonomi açısından son derece önemli olan mikotoksinler ve bu mikotoksinlerin üretiminden sorumlu funguslar ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları mikotoksin varlığının tespiti üzerine yoğunlaşırken, bazı çalışmalar mikotoksinin neden olduğu ve oluşmasının önlenmesi amacıyla yapılmış araştırmalardır (Heperkan, 2009; Schmith-Heydt ve ark., 2011; Zubair ve ark., 2011; Li ve ark., 2012). Tespite yönelik çalışmalar incelendiğinde birçok çalışmada kontamine örnek sayısının ne kadar fazla olduğu ve bu konunun bilimsel açıdan çalışılmasının gerekliliği anlaşılmaktadır. Zubair ve ark. (2011) tarafından Pakistan'nın üç ilçesinden alınan ceviz örnekleri, *Aspergillus flavus*'un sporları ile yapay olarak inoküle edilmiş ve daha sonra, organik asit profili ve aflatoksin analizleri yapılmıştır. İnoküle edilen numunelerdeki aflatoksin içeriği, B1 (245,91 ila 600,84 ng g), B2 (0,00 ila 40,86 ng g), G1 (199,68 ila 1068,48 ng g) ve G2'nin (99,61 ila 30,15 ng g) şeklinde tespit edilmiştir. Yapılan asit profili ve toksin analizlerinden *Aspergillus flavus* gelişimi ve aflatoksin üretiminde substratın kimyasal bileşiminin etkisi olduğu belirtilmiştir (Zubair ve ark., 2011). Kurutulmuş incirlerde okratoksinin doğal oluşumunu inceleyen bir araştırma da, 2003 ve 2004 yıllarında Ege Bölgesi'ndeki 7 farklı ilden kurutma işlemi sırasında 115 örnek alınmıştır. 115 numunenin 55'inde saptanabilir seviyede (0.12-15.31 µg/kg) OTA tespit edilmiştir (Karbancıoğlu-Güler ve Heperkan, 2008). Tüketimi yaygın olan geleneksel kırmızı Çin pirinci, tıbbi bitkiler ve ilgili ürünlerinde CIT doğal oluşumunu inceleyen bir

çalışmada, analiz edilen toplam 109 örneğin %28'inde (31 örnek) 16.6-5253 µg/kg aralığında CIT tespit edilmiştir (Li ve ark., 2012).

Bazı çalışmalar da toksinin neden ve nasıl oluştuğu gibi sorulara cevap aramak amacıyla yapılmıştır. Örneğin, Schmith-Heydt ve ark. (2011), okratoksin üreten türler üzerinde gıdaya uygulanan ışığın etkisi ile ilgili bir araştırma yapmıştır. Bu amaçla, ışığın çeşitli dalgaboylarını OTA biyosentez yeteneği olan *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. steynii* and on *Penicillium nordicum* ve *P. verrucosum* türlerine uygulamıştır. Karşılaştırma amacıyla CIT üreticileri de dahil olmak üzere ışığın çeşitli gıda ile ilgili küflere etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, ışığın (455nm) miselyumun büyümesi üzerinde durdurucu etkiye sahip olduğu, ancak çimlenmekte olan sporlar üzerinde inaktive edici bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu inaktivasyon etkisi tür, dalga boyu ve ışığın yoğunluğuna bağlıdır. Bu gibi araştırmaların gıdalarda toksin varlığını önlemeye yönelik çalışmalar olarak ilerlemesi öngörülmektedir (Schmith-Heydt ve ark., 2011).

### 2.2.2. Zeytinde Fungal Flora ve Mikotoksin Varlığı

Zeytinde gelişen fungal flora üzerine yapılan çalışmalarda *Penicillium* ve *Aspergillus* başta olmak üzere *Alternaria*, *Rhizopilus*, *Eurotium* ve *Cladosporium* fungus türlerinin tespit edildiği bildirilmiştir (Eltem ve Öner, 1995; Göçmen ve ark., 2000). Bunlardan özellikle *Penicillium* ve *Aspergillus*'un toksin üretme yeteneği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Çalışmalar en fazla aflatoksin, OTA ve CIT üzerinde yoğunlaşmıştır.

Zeytinlerde aflatoksin varlığı ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcut olmakla birlikte bazılarında sorun oluşturduğu bildirilmiş, bazı çalışmalarda ise örneklerdeki toksin miktarının ölçülebilir limitin altında kaldığı belirtilmiştir. Arıcı ve ark. (2005), sofralık siyah zeytin ile ilgili bir çalışmada, 64 zeytinin 30'unda aflatoksin B1, 11'inde aflatoksin B2, 6'sında aflatoksin G1 ve 1'inde aflatoksin G2 bulunduğunu bildirmiştir. Yıldırım (2009) tarafından sofralık siyah zeytinde aflatoksinejik küf gelişimi ve aflatoksin oluşumuna *Lactobacillus plantarum* bakterisi ve bazı ekstraktların etkileri incelenmiştir. Bitki ekstraktı olarak *Origanum onites* (İzmir kekiği), *Satureja hortensis* (sater otu-çuprika), *Capsicum annuum* (kırmızı biber), *Olea europaea* (zeytin)'in farklı konsantrasyonları ve potasyum sorbat kullanılmıştır. Etkinin *in vitro* koşullarda belirlendiği çalışmada *O. onites*, *S. hortensis* ve bitki ekstraktlarının potasyum sorbatlı kombinasyonlarının toksin oluşumunu yüksek oranda engellediği belirtilirken, *C. annuum* ve *O. europaea* küf gelişimlerini teşvik ettiği bildirilmiştir. Sonuçta, tüm örneklerdeki aflatoksin miktarı ölçülebilir limitin altında kalmıştır.

Franzettii ve ark. (2011) tarafından İtalya'da zeytinler üzerine yapılan bir market çalışmasında, toplanan 40 örneğin %25'inde aflatoksin B1 tespit edilirken, %58'inde OTA varlığı belirtilmiştir. Zeytinde okratoksin sorunu ile ilgili yapılmış diğer çalışmalar ve elde edilen sonuçların özetleri Çizelge 2.4'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.4. Zeytinde OTA sorunu ile ilgili yapılmış çalışmalar ve elde edilen sonuçlar (Karaca ve Yemiş, 2008)

Ülke	Örnek (sayısı)	Ortalama kontaminasyon (ppb)	Referans
Yunanistan	Zeytinyağı (50)	0,27	Papachristou ve Markaki, 2004
Fas	Siyah zeytin (10)	0,6	El Adlouni ve ark., 2006
Yunanistan	Zeytin ve zeytin ezmesi (30)	1,52	Ghitalou ve ark., 2006
Fas ve İtalya	Zeytinyağı (30)	2,09	Ferracane ve ark., 2007

Mikotoksinlerin *in vitro* koşullarda yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği ile analiz edilmesi uzun süredir kullanılan güvenilir sonuçlar veren bir yöntemdir. Genetik yöntemlerin yanı sıra halen birçok çalışma için tercih edilmektedir. Sofralık zeytin çeşitlerinde OTA ve CIT varlığının hızlı tespiti bu yöntemle gerçekleştirilebilmektedir (Tokuşoğlu ve ark., 2010). Söz konusu tez kapsamında izole edilen ve tanımlanan küflerin bu yöntemle OTA ve CIT oluşturma yeteneği tespit edilmiştir. Benzer şekilde birçok araştırmacı gerek zeytin gerek diğer gıda maddelerine bu yöntemle OTA ve CIT tayini yapmıştır (Tokuşoğlu ve ark., 2010; Wawrzyniak ve Waskiewicz, 2014). Örneğin, Tokuşoğlu ve ark. (2010) tarafından siyah ve yeşil zeytinde CIT riskinin HPLC metodu ile belirlenmesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucu analiz edilen örneklerin önemli bir kısmında toksin tespit edilmiş ve çalışma sonunda yöntemin HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) tekniğinde kontrol analiz metodu olarak kullanılması önerilmiştir. Yine farklı bir araştırmacı tarafından 2014 yılında tahıllarda yapılan çalışmada OTA ve CIT analizi için HPLC metodu kullanılarak ölçülebilir limitin üzerinde sonuçlar elde edilmiştir (Wawrzyniak ve Waskiewicz, 2014).

Sofralık zeytin üretiminde mikroorganizmaların gerçekleştirdiği fermentasyon, üretimin en önemli kısmını oluşturmaktadır. Heperkan D., (2009) tarafından yapılan çalışmada *Penicillium verrucosum*'un siyah ve yeşil zeytinlerde OTA ve CIT üretme yeteği incelenmiştir. Bu amaçla *P. verrucosum* türünün farklı besiyerlerinde, çeşitli sıcaklıklarda gelişme ve OTA ile CIT üretme özelliği belirlenmiştir. OTA miktarı bakımından sıcaklık (20 ve 25°C) ile yeşil ve siyah zeytin arasındaki farkın önemli, CIT'in ise 25°C'de gelişiminin zamanla arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, CIT oluşumu üzerine ise tuz konsantrasyonunun ise pozitif yönde etkisinin önemli olduğu belirtilmiştir.

### **2.3. Moleküler Biyoloji Teknikleri ve Kullanımı**

#### **2.3.1. Moleküler Teknikler ile Fungal Türlerin ve Toksinlerin Belirlenmesi**

Mikroorganizmaların sayımında, izolasyonunda ve tanımlanmasında duyarlılığı yüksek ve kısa sürede sonuç alınan yöntemlerin önemi her geçen gün artmaktadır. Bu hızlı yöntemlerin başında ise moleküler biyoloji teknikleri gelmektedir (Aran, 2012). Gıda ve tarım ürünlerinin mikrobiyolojik analizlerinde de yaygınlaşan moleküler teknikler ile başta patojenler olmak üzere birçok mikroorganizmayı tespit etmek mümkündür (Postollec ve ark., 2011). PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli moleküler teknikler ile hedef gen bölgelerinin çoğaltılması ve sonrasında farklı yöntemler ile bu ürünlerin değerlendirilmesi ve ayrıca, çoğaltılmış ürün üzerinden mutasyon tespitleri de mümkün olabilmektedir (Maurer, 2011).

Ribozomal DNA bölgesi, protein kodlama bölgeleri olan *calmodulin*,  *$\beta$ -tubulin* ve *elongation faktör* fungusların sistematiğinde sıklıkla kullanılmaktadır (Carbone ve Kohn, 1999; Russell ve Peterson, 2006; Gonvaçes ve ark., 2012; Tekeoğlu ve ark., 2017). Jiang ve ark., (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, ceviz (*Juglans regia L.*) kabuğundaki fungal organizmalar tanımlanmıştır. Tanımlama, morfolojik inceleme ve *ITS* primerinin kullanıldığı sekans analizlerine dayanmaktadır. Çalışmanın sonucunda morfolojik gözlem ve *ITS* sekans verileri birbiri ile uyum göstermiş ve fungal florada %99 doğruluk oranı ile *P. lilacinus* tespit edilmiştir.

Toksin analizleri geleneksel yöntemle *in vitro* koşullarda gelişen fungal kolonilerden alınan miselyum parçasından ekstrakt hazırlanması ve HPLC ile analiz edilmesi şeklinde yapılmaktadır. Fakat, son yıllarda ortamdaki potansiyel toksijenik fungal organizmaların toksin üretimiyle ilgili gen bölgelerine spesifik primerler tasarlanarak genetik analizi yoluyla doğrudan toksin üretiminin tespiti önem kazanmıştır (Andreas, 2017).

*Penicillium*, *Aspergillus* ve *Monascus* funguslarında poliketitsentaz (*PKS*) gen

bölgesinin, OTA ve CIT üretiminden sorumlu olduğu önceki çalışmalardan bilinmektedir. Poliketitler, genellikle filamentli funguslar tarafından sentezlenen ikincil metabolitlerdir (Staunton ve Weissman, 2001). *PKS* gen bölgesi ise aflatoksin, okratoksin, sitrinin, sitarigmatoksin ve patulin gibi birçok mikotoksinin üretiminden sorumlu gen bölgesidir (Huff ve Hamilton, 1979; Yang ve ark., 1996; Staunton ve Weissman, 2001; Gallo ve ark., 2010; Abou-Zeid, 2012). OTA, L-fenilalanin amino asidine amide bağlı olan bir izokumarin poliketitten oluşmaktadır (Hayat ve ark. 2012). OTA'nın izokumarin kısmının ise, poliketit sentez yoluyla asetat ve malonattan oluşan bir pentatit iskeletinden türetildiği düşünülmektedir. L-fenilalanin ise şikimik asit sentez yolundan (Yolak kelimesi silinmesi istenmiş) gelmektedir (Moss, 1996; Moss, 1998; O'Callaghan ve ark., 2003; Hayat ve ark. 2012). Şikimik asit sentez yolu, kısaca fenilalaninin esterifikasyonla fenilalanin-etilester'e dönüşmesi olarak tanımlanır (Huff, 1979). *PKS* enzim sistemleri ise tip I, II ve III olarak üç gruba ayrılır. Tip I fungal *PKS*'lerin çoğu, tipik atasal enzimatik yapıya sahip ketoasil sentaz (KS), asil transferaz (AT), ketoredüktaz (KR), dehidrataz (DH) ve enoil redüktaz (ER), metil transferaz (MT), fosfopantetin (PP) bağlanma ve açıl taşıyıcı proteini (ACP) içeren çok fonksiyonlu, monomodüler ve iteratif enzimlerdir (Cox ve Simpson, 2009). İteratif *PKS* enzimleri, tekrar tekrar aynı aktif bölgesini kullanarak asetil- veya malonil-CoA gruplarını poliketid zincirine ekler. Farklı olarak doğrusal *PKS* enzimleri ise poliketit zincirine eklenecek her moleküle özgü bir aktif bölge kullanmaktadır (O'Callaghan ve ark., 2013).

Primer tespitinde *Patulin* gibi bazı mikotoksinlerde problem yaşanmazken OTA gibi toksinler için primer belirlemede bazı sıkıntılar yaşanmaktadır. Okratoksin üreten genler, CIT üreticisi genlerle karıştırılabilen kompleks moleküllerdir (Russell ve Peterson, 2006).

O'Callaghan ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada süpresyon subtraktif hibridizasyon PZR tabanlı teknik kullanılarak *Aspergillus ochraceus* fungusunun OTA biyosentezinde rol oynayan bir poliketid sentaz geninin (*pks*) klonlanması ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışma, *pks* geninin OTA biyosentezinde rol oynadığını ve *pks* gen bölgesi kesilen *A. ochraceus* suşların mikotoksin üretme yeteneğini kaybettiğini göstermiştir. Ayrıca *Ip4kb* klonunun varsayılan/öngörülen amino asit dizisi, veritabanlarında bulunan fungal poliketidsentazlardan açıl transferaz bölgelerine %28-35 homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Yine, O'Callaghan ve ark. (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *Penicillium verrucosum* fungusunun OTA biyosentezinde rol oynayan *otapksPV* geni tanımlanmış ve işlevsel olarak karakterize edilmiştir.

Rodriguez (2014) yapmış olduğu bir çalışmada *P. nordicum*'un 10 kb genomik DNA

fragmanını klonlamıştır. Bu fragman, OTA biyosentetik yolağının iki genini, yani OTA poliketidsentaz genini (*otapksPN*) ve OTA non-ribozomal peptid sentetaz genini (*otanpsPN*) içermektedir. Çalışmada, her iki genin de OTA biyosentezinde gerekli olduğu kanıtlanmış ve konvensiyonel PZR gibi moleküler tekniklerle OTA üreten kalıpları saptamak ve ölçmek için hedef olarak kullanılmıştır.

*Aspergillus niger*'in OTA üreten suşlarının tespiti için yapılan ilk çalışma Castella ve Cabanes (2011)'e aittir. Araştırmacı Real time-PZR ile *Aspergillus niger*'in OTA üretimini tespit edebilecek bir sistem geliştirmeye çalışmıştır. Bu amaçla, iki primer dizayn edilmiş ve *PKS* gen bölgesine ait suşuna spesifik 120 bç'lik ürünün elde edilmesine dayalı teşhis yöntemi geliştirmişlerdir.

Esteban ve ark. (2004), 30 günlük inkübasyon sürecinde *A. carbonarius* ve *A. niger* *agrega* suşlarının, CYA (Czapek Yeast Extract Agar) ve YES (Yeast Extract Agar) agarda büyümesi ve OTA üretimi üzerinde sıcaklığın (5-45°C) etkisini belirlemek amacıyla çalışma yapmıştır. *Aspergillus niger agrega* suşları, ağırlıklı olarak 20-25°C'de ve YES ortamında en yüksek OTA düzeylerine ulaşmıştır. *A. carbonarius* suşları için ise, CYA ortamında, 15 ve 20°C'de en fazla OTA miktarı tespit edilmiştir. OTA üretimi 5 günlük inkübasyondan sonra gözlenmiştir. Çalışmanın bu sonuçlarından yola çıkarak *A. carbonarius* ve *A. niger agrega* fungal türlerinin geniş sıcaklık aralığında üreme kabiliyetleri sebebi ile üzüm, kuru üzüm ve şarap gibi gıda maddelerinde OTA kontaminasyonuna sebep olabileceği bildirilmiştir.

### 2.3.2. Moleküler Yöntemlerin Gıda Mühendisliğinde Kullanımı

Moleküler yöntemler, kahve çekirdekleri, tahıllar, üzümler vb. dahil birçok gıdada fungus florasının tanımlanması için kullanılır. Örneğin, moleküler yöntemler kullanılarak kahve çekirdeklerinde, *Aspergillus spp.* (Magnani ve ark., 2005) varlığı ve üzümlerde, OTA'nın belirlenmesi (Perrone ve ark., 2006) üzerine araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Rodriquez ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada et ürünlerinden *Penicillium nordicum* için OTA üretiminden sorumlu gen belirlenmiş ve primer (primer çifti *otapksPN*; Nükleotid dizilimi *Fpkstr-Rpkstr*) dizayn edilmiştir (Rodriquez ve ark., 2014).

Shimitz-Heydt (2012), yüksek tuz oranına sahip ortamlara adapte olabilen *Penicillium* türüne ait OTA üreten genin biyosentezi ile ilgili çalışma yapmıştır. Geisnen (2004) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise OTA üretiminden sorumlu gen, *Penicillium nordicum* için araştırılmış ve gen bölgesi *otapksPN* olarak belirtilmiştir.

Çevresel koşulların gen aktivitesi üzerine etkisi de araştırılarak 25°C'de ve pH 5,0'in altında en fazla toksinin üretildiği belirtilmiştir (Geisen, 2004).

Dao ve ark. (2005), *A. ochraceus* tarafından okratoksin ve CIT üretimiyle ilgili genlerin çoğaltılması amacıyla *AoLC35-12L/AoLC35-12R* ve *AoOTAL/AoOTAR* primerlerini tasarlamışlardır. Benzer şekilde birçok çalışmada da, toksin üreten genlere ait primer tasarımı gerçekleştirilmiştir (Patin ve ark., 2005; Russel ve Peterson, 2006).

OTA ve diğer mikotoksinlerde olduğu gibi CIT üretimiyle ilgili genlerin belirlenmesi amacıyla da çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Shimizu ve ark., 2005; Baruta ve Bizikocj, 2014; Liu ve ark., 2014). Baruta ve Bizikocj (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, *A. terreus* ATCC 20542 suşunun CIT üretiminden sorumlu gen bölgesi tanımlanmıştır. Shimizu ve ark. (2005), *Monascus purpureus*'da CIT biyosentezi için poliketid sentez gen sorumlusu ile ilgili yaptıkları çalışmada, *PKS (pksTC)* geni ile CIT üretimi arasında ilişki olduğunu bildirmiştir. Liu ve ark. (2014), Uzakdoğu ülkelerinde renk pigmenti (turuncu ve kırmızı) üretiminde kullanılan *Monascus ruber* M7 suşunda CIT üretiminden sorumlu gen ve primeri ile ilgili çalışma yapmıştır. CIT üretimi ile *MpigE* geni aktivitesi arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir. *MpigE* gen aktivitesinin bozulması ile suşun CIT üretimi üzerinde çok az etki gözlenirken, *MpigE*'nin aşırı ekspresyonu sitrinin üretimini büyük ölçüde azaltmıştır.

### 2.3.2.1 Sofralık Zeytin Mikroflorası ile İlgili Moleküler Çalışmalar

Arroyo-Lopez ve ark. (2008) tarafından sofralık zeytinlerdeki mayalar moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Abriouel ve ark. (2011) tarafından, doğal fermente alorena çeşidi sofralık yeşil zeytin fermentasyonu sürecinde moleküler teknikler ile salamuradaki laktik asit bakteri popülasyonunu incelenmiştir. Yunanistan'da Bavaro ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise sofralık siyah zeytinlerden izole edilen 60 fungal izolat moleküler tekniklerden faydalanılarak tanımlanmıştır. Bu tanımlama sonucunda, izolatların 21'i *Penicillium crustosum*, 29'u *P. roqueforti*, 1'i *P. paneum*, 6'sı *P. expansum*, 2'si *P. polonicum* ve 1'i de *P. commune* olarak bildirilmiştir. Tanımlama amacıyla  $\beta$ -*tubulin* ve *ITS* primerleri kullanılmıştır.

Moleküler metotlar, yalnızca sofralık zeytinde ve mikrobiyal florayı tanımlama amacıyla kullanılmamaktadır. Zeytinin sağlıklı ve daha verimli elde edilmesi amacıyla yapılan ekolojik çalışmalarda da moleküler metotlara başvurulduğu görülmektedir. Oliveira ve ark. (2012), zeytin güvesiyle fungal çeşitlilik arasındaki ilişki hakkında bir çalışma gerçekleştirmiştir. Potansiyel entomopatolojik (böcek ve akarlarda hastalık etmeni



olan) funguslar üzerine yapılmış bu çalışmasında, Tras-os-Montes (Portekiz'de bir bölge) zeytin bahçelerindeki fungal çeşitlilik moleküler metotlar kullanılarak belirlenmiş, en yaygın tespit edilen fungal türün *Alternaria* olduğu belirtilmiştir (Oliveira ve ark., 2012).



## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada, Çanakkale il sınırları içerisinde farklı lokasyonlardan toplanan Edremit çeşidi siyah zeytin örnekleri ile organik tarımın gerçekleştirildiği Gökçeada'dan da Ladolia (Ladoles) çeşidi siyah zeytin örnekleri kullanılmıştır. Doğal fermente sofralık tip siyah zeytin üretiminde kullanılmak üzere 3 no'lu deniz tuzu (Billur tuz, Türkiye) ve 10 litrelik plastik kaplar temin edilmiştir. Çanakkale'de üretim yeri bulunan 5 zeytin işletmesinden de salamura ve sofralık zeytin örnekleri toplanmıştır.

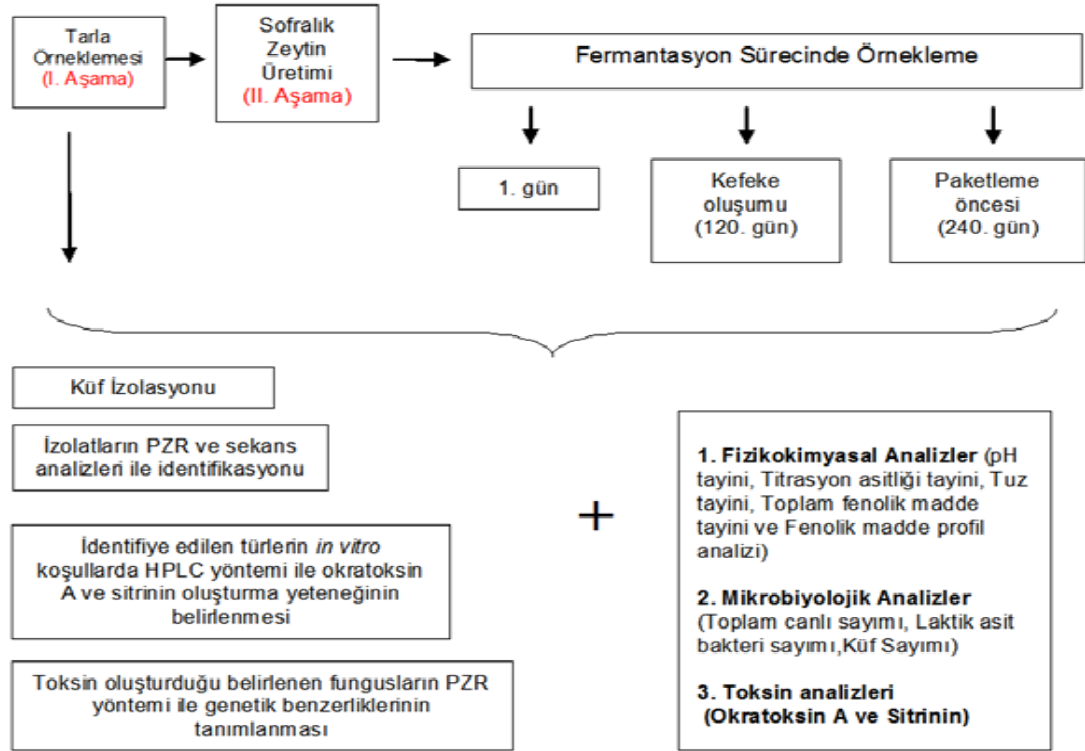
Tez çalışması kapsamında kullanılan (1) Kimyasallar: Sodyum hidroksit, sülfirik asit, metanol, gümüş nitrat, potasyum dikromat, metanol, hekzan, folin-ciocalteu, sodyum karbonat, asetik asit, formik asit, magnezyum sülfat, sakkaroz, asetonitril ve potasyum klorür Merck (Almanya) firmasından ve bakır klorür, neocuprin ve amonyum asetat ise Sigma-Aldrich (Almanya); (2) Besiyerleri: PCA (Plate Count Agar), MRS (Man Rogosa and Sharpe Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), YE (Yeast Extract) ve DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) Merck (Almanya) ve PDB (Potato Dextrose Broth) Acumedia (ABD); (3) PZR Materyalleri: MgCl<sub>2</sub>, dNTP ve SafeView-nükleik asit boyası Applied Biological Materials (Kanada), 1 kb DNA ladder Gene-Aid (Tayvan), DNA marker Amresco (ABD), PZR buffer Invitrogen (UK) ve Taq DNA polimeraz enzimi ise Promega (WI); (4) Standartlar: Gallik asit, hidrokstitirozol, tirozol, rutin, valin, apigenin-7-glikozit ve oleuropein Sigma (Almanya), trolox Mecerck (Almanya), okratoksin A Trilogy (ABD), sitrinin R-Biopharm (ABD); (5) Kitler: i-genomic plant DNA kiti Intron Biotechnology (Kore) ve IAC ise Ochraprep (Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Deneme Planı

Tez çalışması, iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada tarla örnekleme yapılarak fungal flora moleküler tekniklerle incelenmiştir. İkinci aşamada ise Edremit tipi zeytinlerden, doğal fermente siyah zeytin üretimi gerçekleştirilmiş ve fermentasyon sürecinde meydana gelen mikrobiyal ve fizikokimyasal değişimler, toksin oluşumu ile birlikte fungal flora da moleküler tekniklerle incelenmiştir. Bununla birlikte, 5 ticari işletmeden de temin edilen salamura ve sofralık zeytin örnekleri moleküler tekniklerle incelenmiştir. Şekil 3.1'de, deneme planı kapsamında elde edilen örneklere uygulanacak

analizler detaylı olarak görülmektedir.



Şekil 3.1. Deneme planı

### 3.2.1.1. Tarla Örnekleme

Bu amaçla, Çizelge 3.1'de belirtilen koordinatlardaki zeytin bahçelerinden, zeytinlerin hasat döneminde (Kasım-Aralık aylarında) siyah zeytin örnekleme yapılmıştır. Gökçeada, Ezine, Çanakkale (merkez) ve Assos olmak üzere 4 farklı bölge ve farklı lokasyonlarından toprağa düşen zeytin daneleri, ağaç üzerindeki zeytin daneleri (küflü, hastalıklı ve sağlam) ve yaprak (sağlam ve hasta) örnekleri alınarak incelenmiştir. Organik tarım ile zeytin üretimi gerçekleştirilen Gökçeada'da 15 farklı lokasyonda bulunan yabani ve aşılı zeytin ağaçlarından da örnek alınmıştır. Özellikle yabani türlerde, meyvede hastalık ve bariz küf gelişimi gözlenmiş ve böyle örnekler de analiz edilmek amacıyla toplanmıştır. Ezine ve çevresinde Kemallı Köyünden ve İntepe'den 12 farklı lokasyondan olmak üzere aşılı ve yabani zeytin örnekleme gerçekleştirilmiştir. Yine, Assos ve çevresinde yer alan Paşaköy, Behramkale, Kadırğa koyu gibi farklı bölgelerden toplamda 18 lokasyondan aşılı ve yabani zeytin örnekleme yapılmıştır.

Örnekleme koordinasyon ve yükseklik özellikleri ile birlikte ağaç, numune ve izole edilen toplam fungus sayıları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Koordinatlar 'Commander

Compass'programı (Lite 3.7.1, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır. Alınan örneklerin bazıları Şekil 3.2'de görülmektedir.



Çizelge 3.1. Tarla örneklemesine ait bilgiler

Bölge	Koordinatlar		Yükseklik (m)	Kültür özellikleri		Örneklenen meyve sayısı
	Enlem	Boylam		Kültür tipi	Ağaç sayısı	
Gökçeada	40°07'	25°44'	36	Edremit	4	20
				Ladolia	9	
				Yabani	2	
				Yabani	2	
Ezine	39°46'	26°11'	12	Edremit	10	28
				Yabani	2	
Assos	39° 29'	26° 19'	3-118	Yabani	2	16
				Edremit	4	
Çanak kale	40°07'	25°44'	86	Yabani	1	6
				Edremit	1	



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.2. Tarla örneklemesinde alınan zeytin daneleri (a) Gökçeada-Ladolia çeşidi (b) Edremit çeşidi (c)Yabani tür (d) Edremit (hastalıklı)

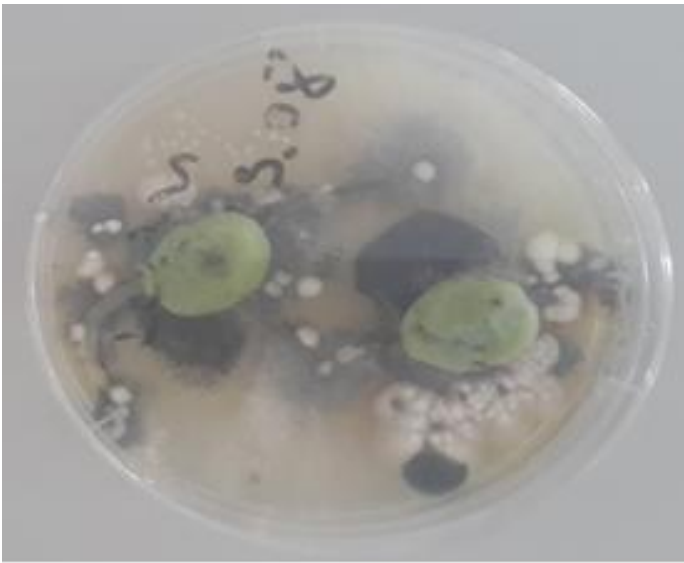
### 3.2.1.2. Doğal Fermente Sofralık Tip Siyah Zeytin Üretimi

Çalışmanın ikinci aşamasında kullanılmak üzere temin edilen Edremit türü siyah zeytin daneleri, yaprak, sap ve çöplerinden ayıklandıktan sonra yıkanmıştır. Takiben, 10 litrelik plastik kaplara zeytin/salamura oranı 7/3 (w/w) olacak şekilde dolun gerçekleştirilmiştir. Son üründe tuz miktarı %5-7 olacak şekilde, salamura olarak kaplara %10 konsantrasyonda tuzlu su ilave edilmiştir. Bu aşamada gerçekleştirilen örnekleme, zeytinlerin fermentasyona bırakıldığı 1. gün, kefeke oluşumu (salamura üstündeki biyofilm) gözlemlendiği dönemde (120. gün) ve fermentasyonun sonlandığı paketlenme öncesi dönemde (240. gün) yapılmıştır.

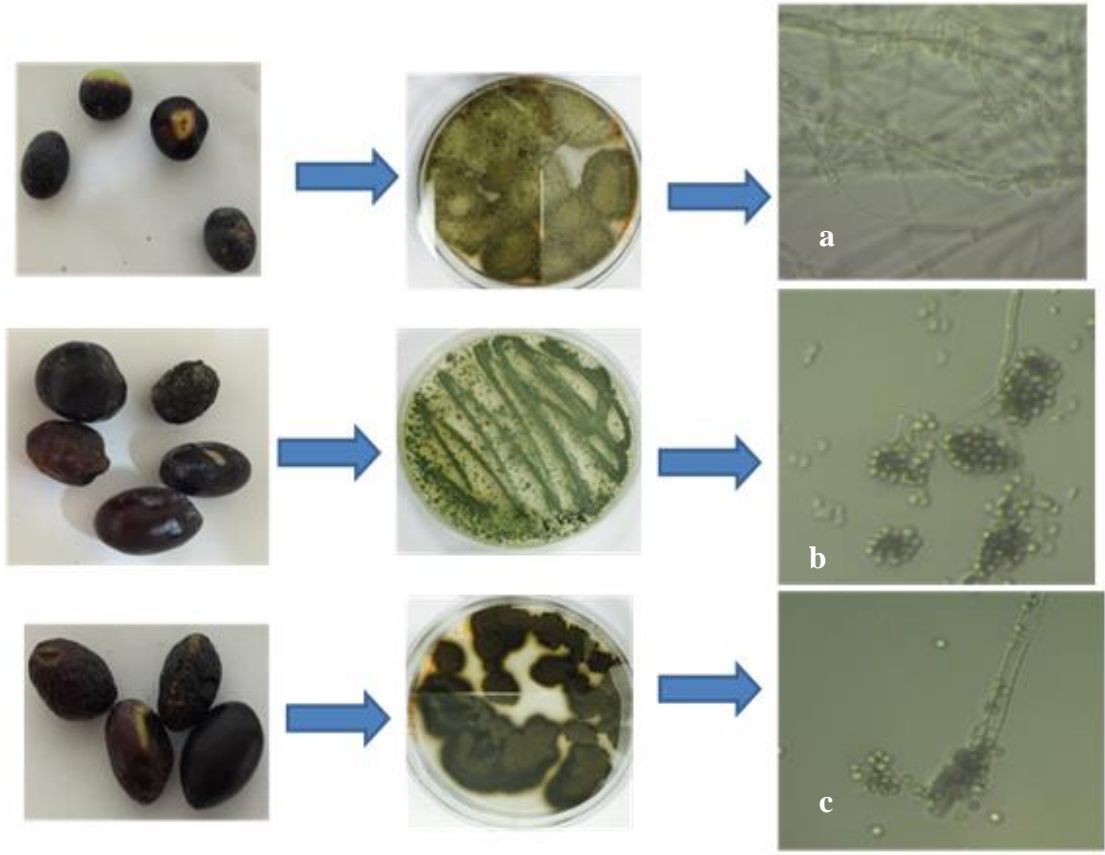
### 3.2.2. Fungal İzolatların Eldesi ve PZR Temelli Moleküler Tanılama

#### 3.2.2.1. Fungal İzolasyonlar ve DNA Ekstraksiyonu

Fungal izolasyonlar, zeytin meyve, yaprak ve kefeke örneklerinden gerçekleştirilmiştir. Zeytin meyvesi ve yaprak örneklerine, öncelikle yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Bu amaçla yıkanan örnekler %2,5 (v/v) hipoklorit (NaOCl) içeren çözeltide 3 dakika bekletilmiş ve steril saf su kullanılarak 3 defa yıkanmıştır. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen örneklerin bir kısmı (özellikle hastalıklı ve küflü bölgeler) kesilerek bir kısmı da bütün meyve halinde, PDA (Potato Dextrose Agar, Merck) içeren besiyeri ortamına aktarılmış ve 5 gün oda sıcaklığı koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 3.3'de fungal materyalin petri kutusunda gelişimlerine bir örnek verilmiştir. Burada gelişen farklı koloni morfolojisi gösteren kültürler, ayrı ayrı PDA'lara aktarılarak saf kültürleri elde edilmiştir. Buradan, tekrar PDA besiyeri ortamına tek spordan veya miselyum ucundan gelişecek şekilde aktarılmıştır. Takiben, ikinci PDA besiyerinde gelişen genç (36-48 saat) küf izolatları da tek spor (SS, single spor) olarak başka bir petriye daha aktarılmıştır. Son aktarılan petri kutusuna aynı zamanda steril Whatman no:1 kağıdı da eklenerek, küflerin bu kağıdın üzerinde gelişmesi ve kağıdın steril bir zarfta gerektiğinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafazası sağlanmıştır. Çalışmalarda tek spordan ve miselyumdan gelişen kültürler kullanılmıştır. Bununla birlikte, fungal izolatlar mikroskop ile de gözlemlenmiştir. Bu spor görüntüleri, genel olarak kültürlerin hangi fungal cinse ait olabileceği hakkında, morfolojilerine dayalı bilgi amaçlı değerlendirilmiştir. Örnek spor görüntüleri Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.3. PDA besiyerinde gelişen fungal materyal



Şekil 3.4. Zeytin örneklerinden elde edilen fungal izolatların petri ve mikroskop görüntüleri (60x) (a)*Alternaria* (b)*Penicillium* (c) *Aspergillus*

DNA ekstraksiyonu amacıyla, tek spordan elde edilen fungal izolatlar, 50 ml'lik sıvı besiyeri (PDB, Potato Dextrose Broth-Acumedica) ortamına aktarılıp, 5 gün 25°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, vakum altında filtre edilmiş ve elde edilen miselyum liyofilize edilmiştir. Liyofilize materyalden, fungusların hif yapısına daha uygun olduğu için tercih edilen i-genomic plant DNA extraction kitleri (Intron Biotechnology, Kore) kullanılarak, DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyonda kit protokolü izlenmiştir.

### 3.2.2.2. Moleküler Tanımlama

Fungal izolatlardan elde edilen ribozomal DNA örneklerinin, *ITS* (internal transcribed spacer) bölgesi ve  $\beta$ -*tubulin* (Beta-tubulin) gen bölgelerine dayalı moleküler tanımlama yapılmıştır. Bu amaçla, *ITS* ve  $\beta$ -*tubulin* bölgeleri, sırası ile *ITS1* ve *ITS4* (White ve ark., 1990) ve Bt2a ve Bt2b (Glass ve Donaldson, 1995) primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Primer çiftlerinin baz dizilimi Çizelge 3.2'de görülmektedir.



25 µL'lik her PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) tüpü; 1X PZR buffer (Invitrogen,UK), 3 mM MgCl<sub>2</sub> çözeltisi (Applied Biological Materials Inc., Kanada), 2 mM dNTP, 0.4 µM ileri ve geri primerler, 1 U Taq DNA polimeraz enzimi (Promega, Madison, WI) ve 10-15 ng DNA içermektedir.

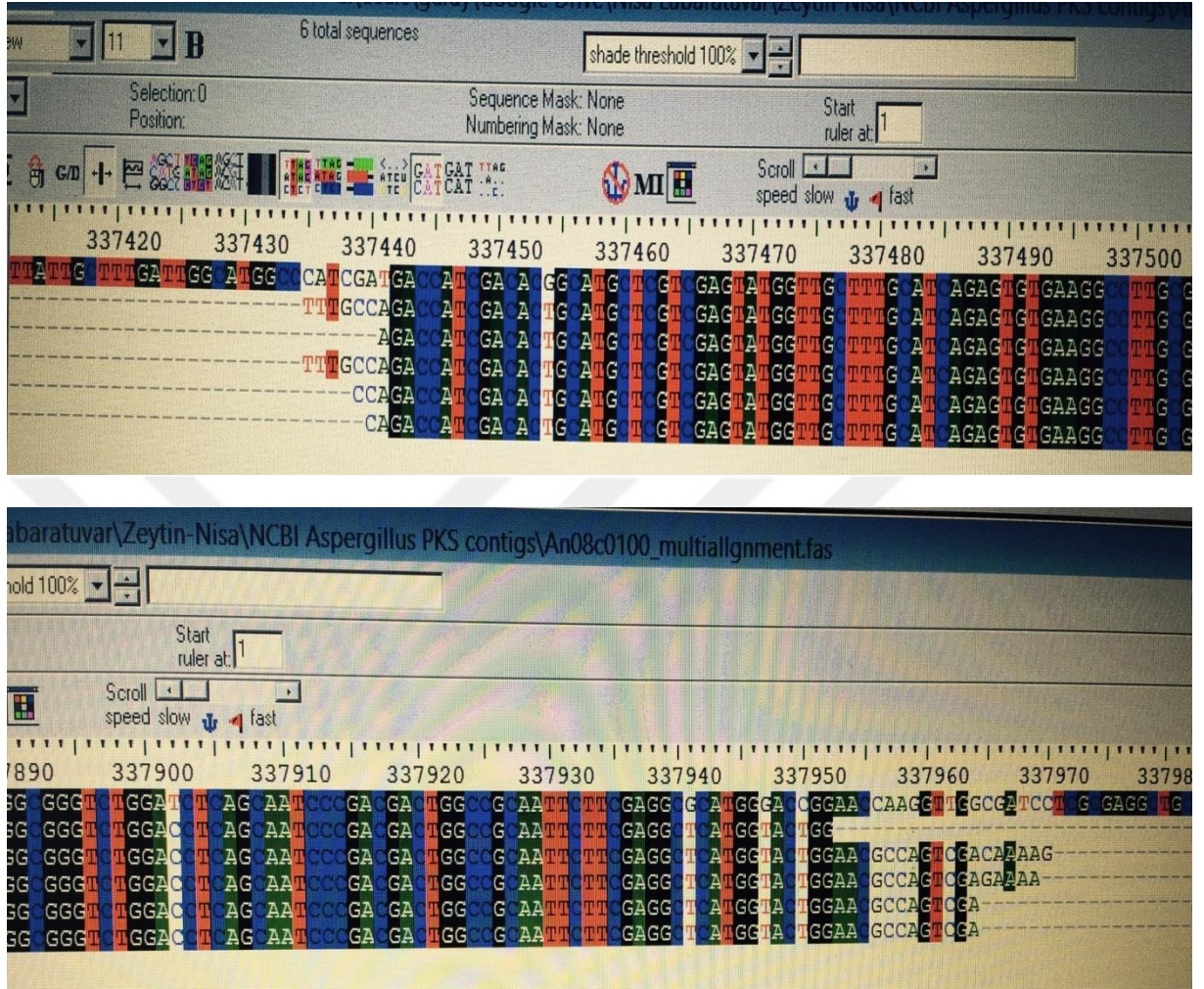
Çizelge 3.2. *ITS* (Internal transcribed spacer) ve *β-tubulin* (Beta-tubulin) primer çiftlerinin baz dizilimi

Primer çiftleri	Baz dizilimi
<i>ITS1</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>Bt2a</i>	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTFTC
<i>Bt2b</i>	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGC

*ITS* bölgesinin çoğaltılması için PZR koşulları; 95°C'de 5 dakika, 95°C'de 20 sn. 35 döngü, 60°C 30 sn. ve 72°C'de 30 dakika, son adımında ise 72°C'de 5 dakikadır. *Beta-tubulin* bölgesinin çoğaltılması için PZR koşulları ise; 95°C'de 5 dakika, 95°C'de 20 sn. 45 döngü, 55-59°C 30 sn. ve 72°C'de 30 dakika, son adımında ise 72°C'de 5 dakikadır. Tüm reaksiyonlar, Thermal Cycler Bio-Rad T100 (Bio-Rad, USA) marka PZR cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen PZR ürünleri, jel elektroforezi (Thermo Scientific, UK) ile gözlenmiştir. %1.5 agaroz jelde yürütülen PZR ürünleri, 5 µL/100 mL konsantrasyonda nükleik asit boyası (SafeView, Applied Biological Materials Inc., Kanada) ile boyama sonrası Vilber Lourmat Quantum ST4 1100 jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak UV ışık altında görüntülenmiştir. Ürünün büyüklüğü 1 kb DNA ladder (Gene aid, Tayvan) ve DNA marker, 250bp (Amresco) kullanılarak tahminlenmiştir. Başarılı bir amplifikasyon sonrası, seçilen bazı örneklerin PZR ürünleri ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ile dizi analizi (sekans) gerçekleştirilmiştir (Medsantek, İstanbul, Türkiye). Sekans sonuçları "Bioedit v7.0.53 for Windows software" (Hall, 1999) kullanılarak düzenlenmiş ve Bioedit yazılımında kullanılan "clustalW" uygulaması ile hizalanmıştır. Sekans verileri ve düzenlenme örneği Şekil 3.5'de görülmektedir. Tüm sekans verileri "BLASTn from the Basic Local Alignment Search Tool" aracılığı ile benzerliklerin araştırılması amacıyla kullanılmıştır (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

(Altschul ve ark.,1990).



Şekil 3.5. Sekans verilerinin Bioedit v7.0.53 programından kısmi örnek görüntüsü

### 3.2.2.3. OTA ve CIT Genlerinin Tespiti

Çalışmanın bu aşamasında, OTA ve CIT üretme potansiyeli olan fungal izolatların bu toksinlerin üretiminden sorumlu gen bölgesine özgü primerler tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bu amaçla, için NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) veri tabanından faydalanılmıştır. OTA ve CIT üretiminden sorumlu genin *PKS* (Poliketitsentaz) gen bölgesinde olduğu bilinmektedir (O'Callaghan ve ark., 2003; Schumann ve Hertweck, 2006). Elde edilen türlerden OTA üretiminden sorumlu olduğu bilinen *A. niger* ve CIT üretiminden sorumlu olduğu ya da olabileceği bilinen *P. expansum* ve *M. pilosus* için önceki çalışmalardan elde edilen *PKS* gen bölgesi bilgisine ulaşılmıştır (Çizelge 3.3). Sekans verileri kullanılarak da, Primer 3 uygulaması üzerinden ([www.bioinfo.uk](http://www.bioinfo.uk)). primerler sentezlenmiştir. Diğer yandan, OTA üretme potansiyeli olan *Aspergillus*

türlerinin belirlenmesi için geliştirilmiş “*AoLC35-12L/AoLC35-12R*” primeri kullanılarak pozitif kontrol yapılmıştır (Dao ve ark., 2005). Sentezlenen primerlerin dizisi, sentezleme için kullanılan gen bölgesi ve ürün baz büyüklüğü Çizelge 3.3'de görülmektedir.

Çizelge 3.3. Primer sentezlenmesi için kullanılan gen bölgesinin "Erişim Numarası" ve ürün baz büyüklüğü

Primer	Primerlerin baz dizilimi	PZR baz büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>AoLC35-12L</i>	GCCAGACCATCGACACTGCATGCTC	~500	Dao ve ark., 2005
<i>AoLC35-12R</i>	CGACTGGCGTTCCAGTACCATGACC		
<i>AN_OTA-F</i>	GGTTGCTTTGCATCAGAGTG	~500	AM270165.1*
<i>AN_OTA-R</i>	CCATGAGCCTCGAAGAATTG		
<i>PE_cit-F</i>	ATCCACACCTGAGACCCAAG	~550	KM603512.1*
<i>PE_cit-R</i>	CAAACGAGTCGCCAAATTC		
<i>M_cit-F</i>	CCCGCAGGATTTGTCTTTC	~450	AY954027.1*
<i>M_cit-R</i>	CGGATCAGATAGTACCTCTTCG		

\* Primer sentezlenmesi için kullanılan gen bölgesinin "Erişim Numarası"

**PZR reaksiyon koşulları;** Tasarlanan primer çiftleri (*AN\_OTA*; *PE\_cit*; *Mon\_Cit*) için PZR koşulları; Bir PZR reaksiyonu 10-15 ng DNA, 10X PZR buffer (Invitrogen,UK), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biological Materials Inc., Kanada), 200 µM dNTPs (Applied Biological Materials Inc., Kanada) ve her primerden 0,4 µM içermektedir. Reaksiyonun sıcaklık ve süre koşulları ise, 95°C'de 5 dakika, 95°C'de 20 sn. 35 döngü, 60°C 30 sn. ve 72°C'de 30 dakika, son adımında ise 72°C'de 5 dakikadır.

Sentezlenen primer çifti (*AoLC35-12L/AoLC35-12R*) için PZR koşulları ise; Bir PZR reaksiyonu 10-15 ng DNA, 10X PZR buffer (Invitrogen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biological Materials Inc., Kanada) 100 µM dNTPs (Applied Biological Materials Inc., Kanada) ve her primerden 0,4 µM içermektedir. Reaksiyonun sıcaklık ve süre koşulları ise, 94°C'de 4 dakika, 95°C'de 40 sn. 35 döngü, 55°C'de 40 sn. ve 72°C'de 40 dakika, son adımında ise 72°C'de 5 dakikadır. Tüm reaksiyonlar thermal cycler Bio-Rad T100 (Bio-Rad, USA) PZR cihazı ile yapılmıştır.

Elde edilen PZR ürünleri %1,5 agaroz jel içeren jel elektroforezi ile incelenmiştir. Görüntü elde etmek için 5 µL/100 mL konsantrasyonda SafeView (Applied Biological Materials Inc., Kanada) nükleik asit boyası kullanılmış ve Vilber Lourmat Quantum ST4

1100 jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak UV ışık altında görüntülenmiştir. Ürün büyüklüğü, 1kb DNA ladder (Gene aid, Tayvan) kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin, ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sistemi ile dizi analizi (sekans) gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.2.4. Fungal İzolatların Genetik Yakınlıkların Belirlenmesi**

Elde edilmiş farklı türlere ait  *$\beta$ -tubulin* kısmı sekans dizileri kullanılarak PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2003) programı ile Neighbour-Joining (Nj) ağacı çizilmiştir. Neighbour-Joining analizinde, 1000 bootstrap istatistikleri ile dallanmalar değerlendirilmiştir. Çizilen Nj ağacının görüntülenmesinde ise, Treeview v1.6.6 programı kullanılmıştır.

### **3.2.3. Kimyasal Analizler**

#### **3.2.3.1. pH Tayini**

Oda sıcaklığındaki 50 ml salamura ve 50 g tartılıp blenderdan geçirilmiş zeytin örneklerinin pH değerleri, pH metre cihazı (Ohaus Starter 3100, ABD) kullanılarak belirlenmiştir.

#### **3.2.3.2. Titrasyon Asitliği**

Örneklerin titrasyon asitliği değerleri, potansiyometrik titrasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla zeytin danesinden 10 g ve salamuradan 10 ml örnek alınarak 0,1 N NaOH çözeltisi ile pH 8,1'e ulaşıncaya kadar titre edilmiş ve titrasyon asitliği susuz laktik asit cinsinden % laktik asit olarak hesaplanmıştır (Cemeroğlu, 2010).

#### **3.2.3.3. Tuz Tayini**

Salamura ve zeytin örneklerinin tuz içerikleri, mohr titrasyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. 5 g zeytin danesi, 10 ml salamura örnek üzerine 60-70°C'deki saf su ilave edilmiş ve sıvı kısım 500 ml'lik balon jodelere aktırılmıştır. Aynı işlem, 5-6 kez tekrarlanarak örneklerde bulunan tuzun tamamının suya geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra balon jodelerde toplanan su 500 ml'ye tamamlanmış ve homojen karıştırıldıktan sonra 25 ml alınarak üzerine 0,5 ml potasyum dikromat indikatörü eklenip 0,1 N AgNO<sub>3</sub> çözeltisi ile titre edilmiştir. Elde edilen sarfiyat miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır (Anonim, 1983). Örneklerin tuz miktarı % tuz olarak verilmiştir.

$$\%Tuz = [(V-V_0) \times F \times 0,585] / M \quad (3.1)$$

V: AgNO<sub>3</sub> sarfiyatı (ml)

V<sub>0</sub>: Kör için harcanan sarfiyat (ml)

M: alınan örnek miktarı (g)

F: AgNO<sub>3</sub> çözeltisinin ayar faktörü

### 3.2.3.4. Toplam Fenolik Madde Analizi

Ekstraksiyon: Zeytin danesi ve salamuradan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu amacıyla, Kiai ve Hafidi (2014) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla, 10 g homojenize zeytin ve 50 ml salamura örnekleri üzerine ayrı ayrı 20 ml metanol:su (80:20 v/v) çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığı koşullarında orbital çalkalayıcı (Heidolph Unimax 2010, Almanya) kullanılarak 150 rpm hızda 15 dk. süre ile karıştırılmıştır. Karışım, 7800 rpm'de 10 dk. santrifüj (Sigma, Almanya) edilmiştir. Daha sonra, metanol fazı ayrılmış ve alt faza aynı işlem tekrarlanmıştır. İki ayırma işleminden elde edilen metanol fazı toplanmış ve üzerine aynı oranda hekzan eklenerek oda sıcaklığı koşullarında 15 dk. süre ile 150 rpm hızda karıştırılmıştır. Karışım, 10 dk. süre ile 7800 rpm hızda santrifüj (Sigma, Almanya) edilmiştir. Hekzan fazı uzaklaştırılmasını sonucunda elde edilen ekstrakt 0,20 µm şırınga uçlu teflon filtreden geçirilmiştir.

Analiz: Örneklerin toplam fenol içerikleri, spektrofotometrik bir metot olan "Folin-Ciocalteu" yöntemine göre belirlenmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). Bu yöntemin ilkesi, fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin-Ciocalteu ayracını indirgeyip, kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin ayracı ile muamele sonrası oluşacak mavi renk, spektrofotometrede 720 nm dalga boyunda şahide karşı okunmuştur. 100 µl ekstraktı üzerine sırasıyla 900 µl saf su, 5 ml 0,2 N Folin-Ciocalteu (Merck, Almanya) çözeltisi ve 4 ml %7,5'lik sodyum karbonat (Merck, Almanya) çözeltisi eklenmiştir. Karıştırma işlemi takiben oda sıcaklığında 2 saat süre ile bekletilmiştir. Örneklerin fenolik bileşen miktarı, gallik asit (Sigma Aldrich, Almanya) ile hazırlanan standart eğrinin regresyon eşitliği ( $y=0,001x+0,022$ ;  $R^2 = 0,998$ ) kullanılarak hesaplanmıştır. Örneklerdeki toplam fenolik madde miktarı "mg gallik asit/g" ve "mg gallik asit/ml" cinsinden ifade edilmiştir.

### 3.2.3.5. Fenolik Bileşen Profil Analizi

Ekstraksiyon;

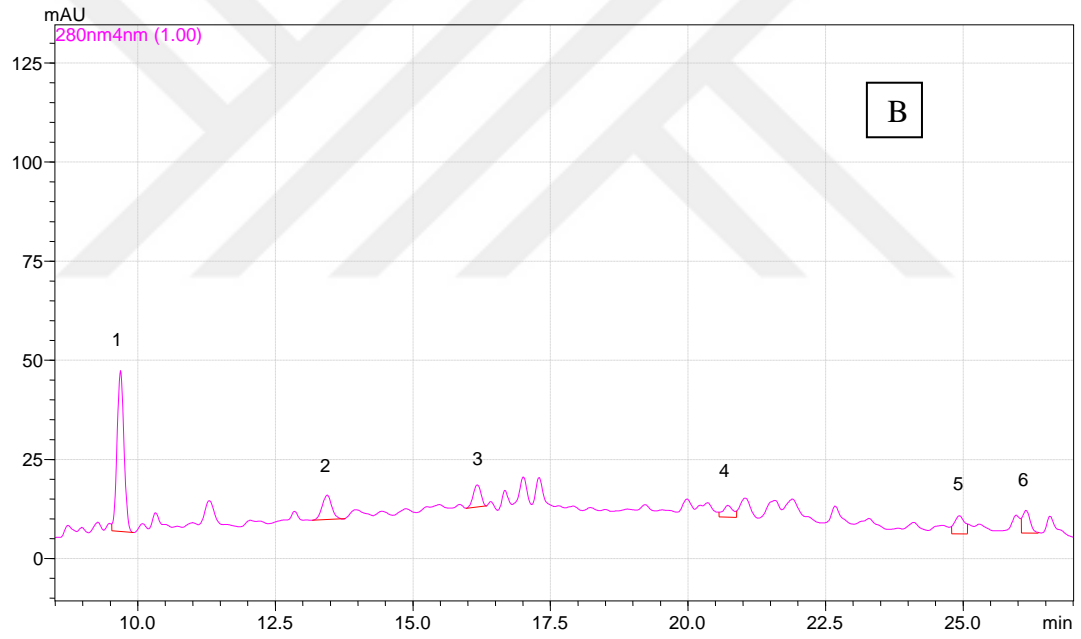
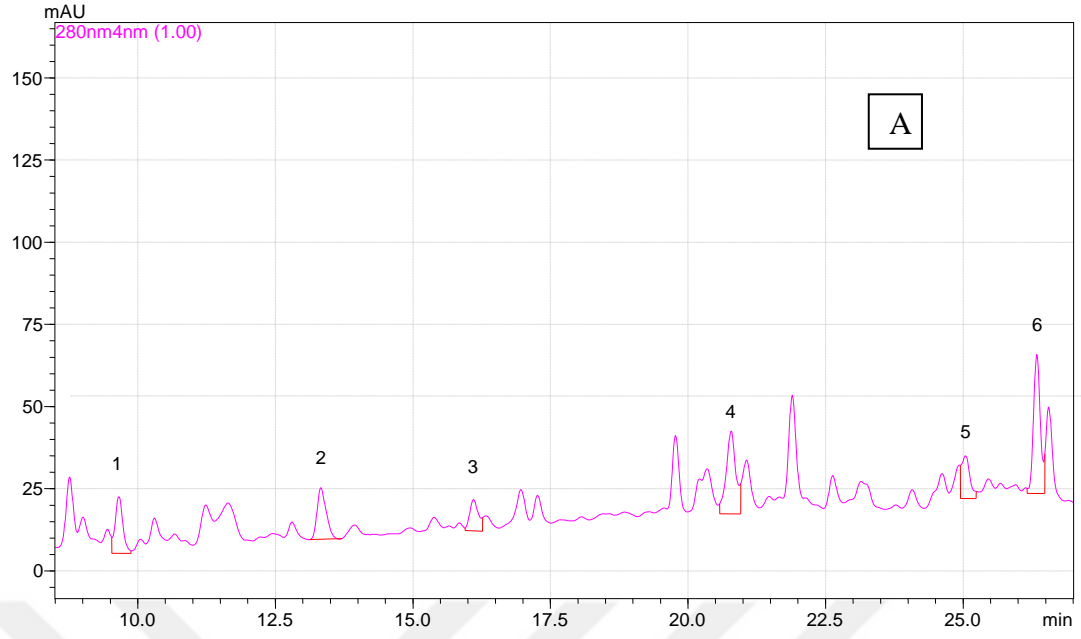
Toplam fenolik madde analizi için elde edilen zeytin ve salamura ekstraksiyonları fenolik bileşen profil analizi amacıyla da kullanılmıştır (Kiai ve Hafidi, 2014).

HPLC ile Fenolik Bileşen Analizi;

Çizelge 3.4. Fenolik madde profil analiz metodunda kullanılan gradient programı

Süre (dk.)	%A Ultra saf su/ asetik asit (97,5/2,5 v/v)	%B Asetonitril
0	95	5
20	75	25
15	50	50
5	20	80
5	95	5

Fenolik bileşen profil analizi, Kiai ve Hadifi (2014)'e göre elde edilen ekstraktlara Luo (2011) ve Benevente-Garcia ve ark. (2000) tarafından bildirilen metot modifiye edilerek uygulanmıştır. Analizler, C<sub>18</sub> (250×4,6mm ID, 5µ; Phenomenex Gemini, ABD) ters faz kolon ile entegreli HPLC/DAD (Shimadzu LC 20A, Japonya) sistemi kullanılarak yapılmıştır. Metotta, mobil faz olarak ultra saf su/asetik asit (97.5/2.5, v/v; Mobil faz A) ve asetonitril (Mobil faz B) ile gradient akış uygulanmış olup 1mL/dakika hızla akış programı ise Çizelge 3.4'de gösterilmektedir. Çalışma boyunca kolon sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmıştır. 200-600 nm arasında spektrum taranmış olup fenolik bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizleri 280 nm dalgaboyundaki örnek kromatogramları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 280 nm dalgaboyunda elde edilen kromatogram görüntüsünün bir örneği Şekil 3.6'de görülmektedir.



Şekil 3.6. 1. gün (A) ve 240. gün (B) fermentasyonda zeytin danesinin fenolik kompozisyonuna ilişkin kromatogramlar:1 (hidroksitirozol), 2 (tirozol), 3 (vanilin), 4 (rutin), 5 (apigenin 7-glikozit), 6 (oleuropein).

Uygulanan metotta elde edilen kromatogramda bulunan piklerin kalitatif ve kantitatif analizleri amacıyla hidrokstitirozol, tirozol, rutin, apigenin-7-glikozit, vanilin ve oleuropein standartları (Sigma Aldrich, Almanya) ile Çizelge 3.5’da görülen regresyon eşitlikleri elde edilmiştir. Kalitatif analiz amacıyla, standartların alıkonma zamanları (Rt, retention time; Çizelge 3.5) ve ekstrakta standart ekleme yöntemi dikkate alınmıştır. Kantitatif analiz ise dış standart yöntemi ile 1-1000 ppm konsantrasyon aralığında hazırlanan regresyon eşitlikleri (Çizelge 3.5) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki kalitatif olarak tanımlanan her bir fenolik bileşen miktarı kantitatif olarak ppm (mg/L salamura ve mg/kg zeytin) cinsinden hesaplanmıştır.

Çizelge 3.5. Fenolik madde profil analiz metoduna ait alıkonma zamanı, konsantrasyon aralığı ve regresyon eşitliği

Fenolik Standartlar	Alıkonma zamanı (dak)	Konsantrasyon Aralığı (ppm)	Regresyon	R <sup>2</sup>
Hidroksitirozol	9.68	10-1000	$y = 368,17x - 24949$	0,9808
Tirozol	13.34	10-100	$y = 5098,6x - 60592$	0,9904
Vanilin	16.09	5-100	$y = 30540x + 50079$	0,9972
Rutin	20.76	1-50	$y = 46424x - 5349,2$	0,9965
Apigenin 7-glikozit	25.06	1-50	$y = 14112x + 102710$	0,9559
Oleuropein	26.33	25-1000	$y = 5771,1x - 15935$	1

### 3.2.3.6. Antioksidan Analizi (CUPRAC-Cupric Reducing Antioxidant Capacity Metodu)

Toplam fenolik madde analizi için zeytin ve salamura örneklerinden elde edilen ekstraktların, Apak ve ark., 2004 tarafından önerilen CUPRAC metodu ile antioksidan analizleri gerçekleştirilmiştir. 30 µl örnek üzerine, sırasıyla, 1 ml 0,01M bakır klorür (Sigma Aldrich, Almanya), 1 ml neocuprin (Sigma Aldrich, Almanya), 1 ml 1 M'lık amonyum asetat (Sigma Aldrich, Almanya) çözeltisi (pH 7) ve 1080 µL saf su eklenmiştir. Karışım, 30 dk. bekletilmiştir. Takiben, spektrofotometrik ölçümler amacıyla 450 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Trolox standardı (Merck, Almanya) kullanılarak kalibrasyon eğrisi ( $y=0,0008x+0,140$ ;  $R^2=0,993$ ) oluşturulmuştur ve sonuçlar "mg



trolox/kg" eşdeğeri olarak hesaplanmıştır.

### **3.2.4. Mikrobiyolojik Analizler**

#### **3.2.4.1. Toplam Canlı Sayımı**

$10^1$ - $10^6$  aralığında hazırlanan örnek dilüsyonlarından 1 ml, steril petrilere aktarılarak dökme plak yöntemine göre PCA (Plate Count Agar, Merck) ekim yapılmıştır. Petriler, 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda gelişen koloniler sayılmıştır (AOAC, 2000). Sonuçlar "log kob/g" ve "log kob/ml" olarak ifade edilmiştir.

#### **3.2.4.2. Laktik Asit Bakteri Sayımı**

Toplam laktik asit bakteri sayımı, Marshall (1992)'ye göre çift tabaka dökme plak yöntemi ile yapılmıştır.  $10^1$ - $10^6$  aralığında hazırlanan örnek dilüsyonlarından aseptik ortamda 1 ml alınarak steril petrilere ekim yapılmıştır. Üzerine önceden hazırlanmış ve 45-50°C sıcaklığında MRS (Man Rogasa Sharpe, Merck) agardan 10 ml aktarılmıştır. Mikroorganizmaların homojen dağılımı için dikkatlice karıştırılan petriler, besiyerleri katılaştıktan sonra, 10 ml daha besiyeri dökerek katılaşması beklenmiştir. 30° C'de 48 saat inkübasyon sonrası gelişen koloniler sayılmıştır. Sonuçlar "log kob/g" ve "log kob/ml" olarak ifade edilmiştir.

#### **3.2.4.3. Küf-Maya Sayımı**

Küf-maya sayımı, Dağdemir (2006)'ya göre yapılmıştır.  $10^1$ - $10^6$  aralığında hazırlanan örnek dilüsyonlarından, aseptik ortamda 1 ml alınarak steril petrilere ekim yapılmıştır. Üzerine önceden hazırlanmış DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar, Merck)'dan 15-20 ml aktarılmıştır. Mikroorganizmaların homojen dağılımı için dikkatlice karıştırılan petriler, besiyerleri katılaştıktan sonra, 25° C'de 3-5 gün inkübe edilmiş ve gelişen koloniler sayılmıştır. Sonuçlar "log kob/g" ve "log kob/ml" olarak ifade edilmiştir.

### **3.2.5. Toksin (OTA ve CIT) Analizi**

#### **3.2.5.1. Ekstraksiyon**

Zeytin fermentasyon sürecinde 1., 120., 240. günler ve 18. ay olmak üzere toksin analizi için örnekleme yapılmıştır. Aynı zamanda, fermentasyon sürecinde örneklenen materyallerden izole edilen küfler uygun koşullarda (-20°C) saklanmış ve toksin oluşturma potansiyelleri moleküler yöntemlerle belirlendikten sonra petri ortamında toksin üretip

üretmedikleri kontrol edilmiştir. Elde edilen her iki tip örnekten de toksin ekstraksiyonu yapılmış ve HPLC (Shimatzu, Japonya) cihazı ile toksin analizinde kullanılmıştır.

Zeytin örneğinden ekstraksiyon;

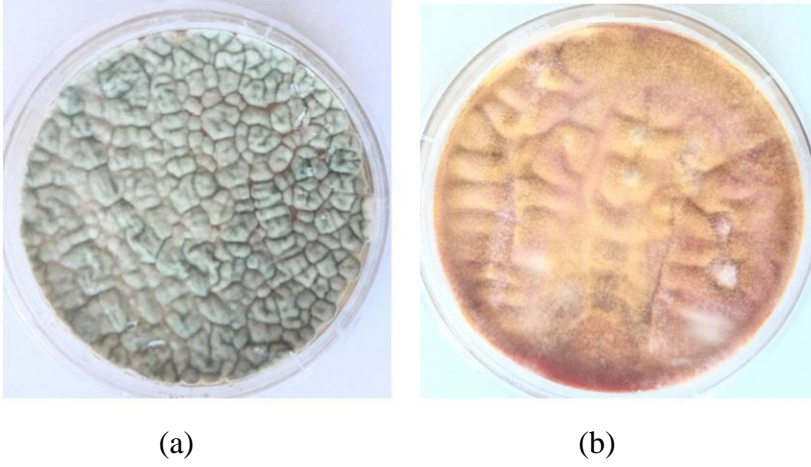
Zeytin örneğinden ekstraksiyon işlemi, Tokuşoğlu ve ark. (2010) tarafından önerilen metot kullanılmıştır. 25 g homojenize zeytin ezmesi üzerine, 180 ml ACN, 20ml KCl (%4 w/v), 2ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (%20 w/w) eklenmiş ve karışım 3500 g'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, Whatman no:4 filtre kağıdı kullanılarak filtre edilmiştir. Elde edilen filtrat üzerine 50 ml hekzan eklendikten sonra karışım 10 dakika ayırma hunisinde çalkalanmıştır. Çalkalama süresi sonunda ayırma hunisinde 3 faz oluşmaktadır. Oluşan fazların görüntüsü Şekil 3.15'de verilmiştir. Ayırma hunisinin en alt kısmındaki 3. faz toksin fazıdır. Bu faz alınarak 10 ml CCl<sub>4</sub> ile karıştırılmıştır. Karışım IAC (Ochraprep, Almanya) kolonundan akış hızı saniyede 1-2 damla olacak şekilde geçirilmiştir. Takiben, kolon, PBS buffer ile yıkanır ve 2 ml MeOH ile tekrar yıkanarak kolondan toksinlerin alınması sağlanmıştır.



Şekil 3.7. Toksin ekstraksiyonunda oluşan toksin fazının görüntüsü

İzolatlardan ekstraksiyon; İzolatlardan ekstraksiyon amacıyla, Munoz ve ark. (2011) tarafından önerilen metot kullanılmıştır. Bu metoda göre -20°C'de saklanan izolatlar PDA (Potato dextrose agar) ortamında 25 °C'de 5 gün canlandırılmıştır. Canlandırılan izolatlar, Yeast Extract Agar (20 g Yeast extract; 150 g Sucrose; 20 g Agar; 0,5 MgSO<sub>4</sub>) ortamında 7 gün 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonundaki petri görüntüleri Şekil 3.16'da verilmiştir. Petrinin ortasından kenarına doğru üç adet 6mm'lik kesit alınmıştır. Aseptik koşullarda ependorf tüpüne aktarılan kesitlerin üzerine 900 µl MeOH eklenerek 1 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant 0,20 µm PDFE şırınga ucu filtreden geçirilerek 1ml'lik viallere

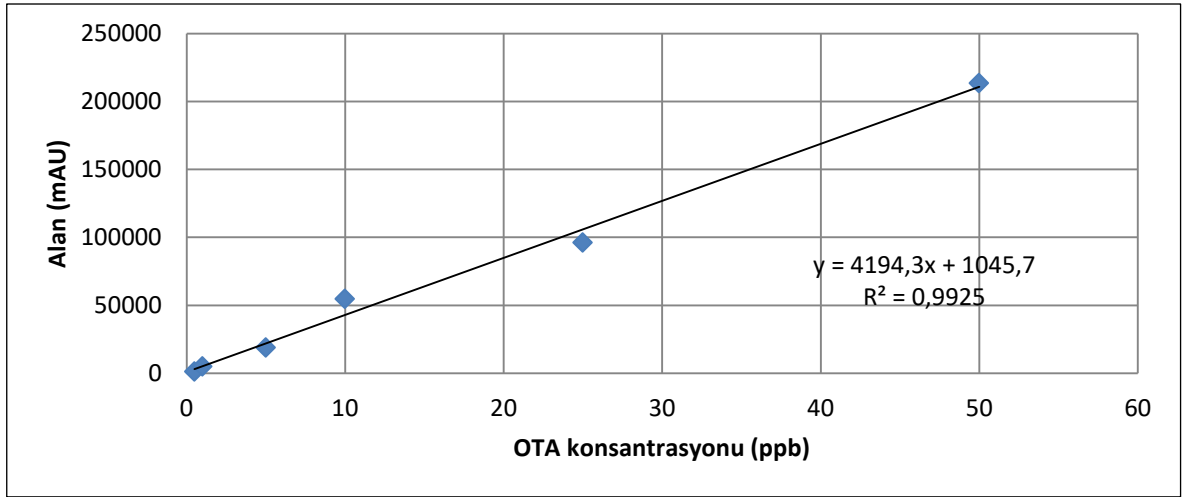
alınmıştır.



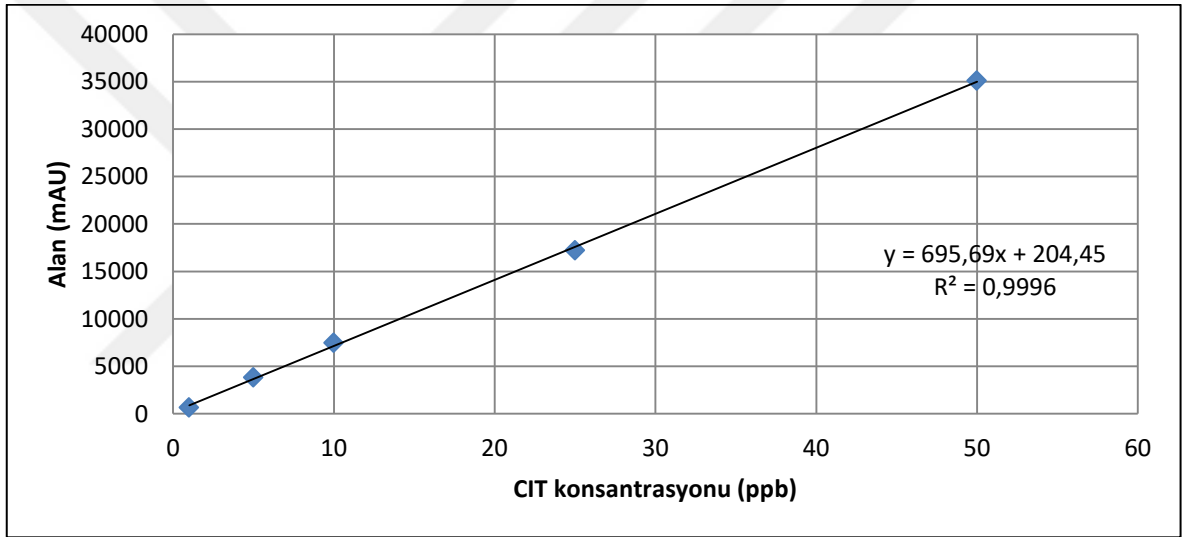
Şekil 3.8. YES agarda gelişen fungal izolatlar (a) *Penicillium* (b) *Monascus*

### 3.2.5.2. HPLC Analizi

Örnek ekstraktlarının OTA ve CIT analizi amacıyla, El Adlouni ve ark. (2006) ve Tokuşoğlu ve ark. (2010) tarafından bildirilen koşullara göre C18 ters faz kolon (250 mm, 4.6ID, 5 $\mu$ ; InertSustain, GL Sci. Inc., Japonya) entegreli HPLC/FLD (Shimadzu LC 20A/RF-20Axs Floresan (FL) dedektör, Japonya) sistemi kullanılmıştır. Sistemde, mobil faz olarak asetonitril/su/formik asit (60/38/2, v/v/v; pH 2.5) çözeltisi, 1 mL/dak akış hızına ayarlanmıştır. Kolon fırın sıcaklığı 30°C'dir. FL dedektörde, ekstinsiyon (Ex) ve emisyon (Em) dalgaboyları, sırasıyla, 333 nm ve 495 nm olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerin sisteme enjeksiyon hacmi ise 10  $\mu$ l'dir. Örneklerdeki toksin konsantrasyonlarının belirlenmesi amacı ile OTA (Trilogy, USA) ve CIT (R-Biopharm, USA) standartları kullanılarak belirli konsantrasyonlarda aynı metot ile cihaza enjekte edilerek elde edilen regresyon eşitlikleri (Şekil 3.17; Şekil 3.18) kullanılmıştır. HPLC analizlerinden elde edilen kromatogram görüntülerinden bazıları Ek:1, Ek:2, Ek:3, Ek:4, Ek:5 ve Ek:6'da gösterilmektedir.



Şekil 3.9. OTA standart eğrisi ve regresyon eşitliği



Şekil 3.10. CIT standart eğrisi ve regresyon eşitliği

### 3.2.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen kimyasal ve mikrobiyolojik analiz verileri Minitab (Minitab 16) ve SAS V9 (SAS, 1999) istatistik paket programları kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm analizler 4 tekerrür olarak yapılmış ve ortalamaların karşılaştırılmasında önemlilik düzeyi  $P < 0,05$  olarak dikkate alınmıştır. Mikrobiyal yük verilerinin istatistiksel analizleri SAS V9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) programında proc MIXED ve repeated fonksiyonu kullanılarak ortalama değerler (LS means) ve ortalamalar arasındaki farklar ise Tukey testi ile belirlenmiştir. Kimyasal parametreler ve fenolik bileşenlere ait verilerin istatistiksel analizleri ise Minitab (Minitab 16) programı kullanılarak "one way ANOVA" tekniği ile gerçekleştirilmiştir.

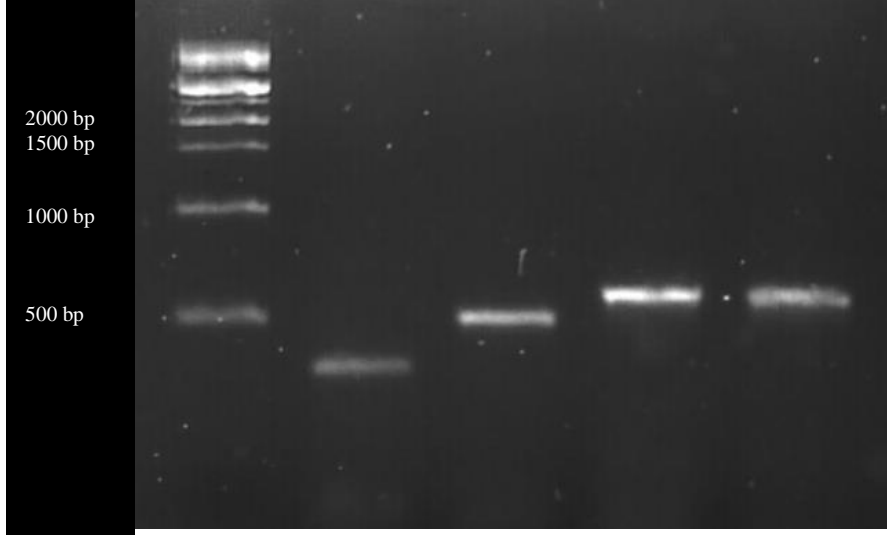
## BÖLÜM 4

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 4.1. Tarladan Sofraya Fungal Türlerin Moleküler Tanımlanması

##### 4.1.1. Moleküler Tanımlama

Çalışma kapsamında, tarla örneklemesinden 57 fungal izolat, sofralık zeytin üretim sürecinde fermentasyonunun ilk gününden alınan örneklerden 22 fungal izolat, kefeke oluşumunun başladığı 120. günde alınan örneklerden 17 fungal izolat ve fermentasyonun sonlandırıldığı dönem olan 240. günde alınan örneklerden 17 fungal izolat olmak üzere toplam 113 fungal izolat elde edilmiştir. Bununla birlikte, Çanakkale il sınırları içerisinde faaliyet gösteren tesadüfi seçilmiş beş ticari işletmenin fermentasyon sonundaki ürünlerinden de 17 fungal izolat elde edilmiştir. İzolatlarda tür belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen ITS bölgesi amplifikasyonu sonucunda, yaklaşık 200 baz çifti (bç) bant oluşmasına rağmen elektroforez jel görüntülemesinde türlere spesifik baz büyüklüğünde bantlar elde edilememiştir. Bu nedenle tür tanımlaması  $\beta$ -*tub* primeri ile gerçekleştirilmiştir.  $\beta$ -*tub* amplifikasyonu ile devam edildiğinde ise farklı fungal cinslerin %1,5'luk agaroz jelde elde edilen görüntüleri incelendiğinde, amplifikasyon ürün büyüklüklerinin farklı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Bu avantajlı durumun daha hızlı bir tanımlamaya fırsat vermesi nedeniyle cins bazında tanımlamalara  $\beta$ -*tub* gen bölgesi amplifikasyonu ile devam edilmiştir. Şekil 4.1'de görüldüğü üzere,  $\beta$ -*tub* ürün büyüklüklerinin *Alternaria* için 400 bç, *Penicillium* için 500 bç ve *Aspergillus* için 600 bç olduğu tespit edilmiştir. Buna ilaveten, *Monascus* izolatları da *Aspergillus* ile benzer şekilde 600 bç ürün vermiştir. *Aspergillus* ile *Monascus* türlerinin birbirinden ayrılması yalnızca sekans verileri ile mümkün olmuştur. Tür bazında teşhisler ise çoğaltılan bu  $\beta$ -*tub* bölgelerinin baz dizilim verileri kullanılarak yapılmıştır. Sekans analizlerinden elde edilen baz dizilimleri her bir tür için Ek:9'da verilmiştir.



Şekil 4.1. *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Monascus* fungal türlerin  $\beta$ -tubulin primeri ile PZR ürün görüntüleri (a) *Alternaria* (~400 bç) (b) *Penicilium* (~500 bç) (c) *Aspergillus* (~500 bç) (d) *Monascus* (~600 bç).

Çalışmanın devamında, tüm izolatlar  $\beta$ -tub primeri ile amplifiye edilmiştir. Çünkü,  $\beta$ -tub gen bölgesinin sekans bilgileri, izolatları tür bazında tanımlanmasını sağlamıştır. 130 izolattan 77'sine sekans analizi uygulanmıştır. Sekans verileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) gen bankasındaki bilgilerle karşılaştırılmış ve en fazla uyum gösterenler Çizelge 4.1'de belirtilmiştir. Çizelge 4.1 incelendiğinde, elde edilen her bir tür için örnek sekans verisinin NCBI gen bankasında önceden tanımlanmış başka sekans verisi ile en az %99 benzerlikte olduğu görülmektedir. Baz büyüklükleri 264-535 bç arasında değişmektedir. Söz konusu veriler kullanılarak yapılan tanımlamaya ait bilgiler ise Çizelge 4.2'de gösterilmektedir. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi, toplamda 43 *Penicillium* türü ve 19 *Aspergillus* türü izole edilmiştir. Bunlardan *P. expansum*, *A. niger*, *A. tubingensis* ve *M. pilosus* izolatlarının aflatoksin, OTA ve CIT gibi mikotoksinleri üretme potansiyeline sahip oldukları bilinmektedir. Dolayısı ile bu türlerin hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilebilmesi önemlidir. Tarladan sofraya fungal flora, türlerin bulunma sıklığı açısından değişim göstermektedir.  $\beta$ -tub sekansı *Alternaria* cinsinde tür bazında bilgiye sahip olmamıza yeterli olmamıştır. Morfolojik olarak spor yapıları küçük olan *Alternaria* türlerini, tür bazında tanımlamanın oldukça zor olduğu bilinmektedir. Bu nedenle *Alternaria* türleri, *Alternaria* spp. olarak tanımlanmıştır. Fakat, aynı izolatların kullanıldığı başka bir çalışmadan elde edilen sonuçlara göre mevcut *Alternaria* türlerinin morfolojik tanımlamaları ve *Endopolygalacturanase* verilerine dayanarak izolatların *A.*

*alternata* olduğu tespit edilmiştir (Özkılınç ve Sema, 2018).

Çizelge 4.1. *β-tub* sekans verilerine göre tanımlanan fungal izolatların NCBI gen bankası ile uyumu

İzolat	İzolatın kaynağı	Sekans uzunluğu (bç)	Benzerlik *	En iyi eşleşen referans **
<i>A. alternata</i>	Tarla örnekleme- Zeytin danesi	280	99%	KU512287.1- <i>Alternaria alternata</i> ITS Beta-tubulin
<i>P. crustosum</i>	Zeytin danesi- fermentasyonun 1.günü	392	100%	FJ004401.1- <i>Penicillium crustosum</i> Beta-tubulin
<i>P. glabrum</i>	Tarla örnekleme- Zeytin danesi	353	99%	EU128585.1- <i>Penicillium glabrum</i> Beta-tubulin
<i>P. roquefortii</i>	Salamura- fermentasyonun 1.günü	445	99%	AY674382.1- <i>Penicillium roquefortii</i>
<i>P. expansum</i>	Salamura- fermentasyonun 1.günü	362	99%	LN896431.1- <i>Penicillium expansum</i>
<i>P. brevicompactum</i>	Tarla örnekleme- Zeytin danesi	264	99%	AY674436.1- <i>Penicillium brevicompactum</i>
<i>A. niger</i>	Tarla örnekleme- Zeytin danesi	535	100%	KC175288.1- <i>Aspergillus niger</i> Beta-tubulin
<i>A. tubingensis</i>	İşletme örnekleme- Kefeke- fermentasyonun 1.günü	447	99%	HQ632767.1- <i>Aspergillus tubingensis</i> Beta-tubulin
<i>M. pilosus</i>	Kefeke- fermentasyonun 1.günü	484	99%	AB607170.1- <i>Monascus pilosus</i>

\*NCBI'da en iyi eşleşen sekans verisi ile sekans benzerlik oranı

\*\*NCBI-Genbank'da in iyi eşleşen sekans verisine ait gen bankası veri numarası

#### 4.1.2. Tarla Örneklemesinden Elde Edilen Fungal Flora

Çalışmanın bu aşamasında Gökçeada, Ezine, Assos ve Çanakkale (Merkez)'de bulunan zeytin bahçelerindeki 35 ağaçtan örnek alınmıştır. Farklı lokasyonda bulunan aşılı zeytin ağaçlarından toplanan örneklerden 42 izolat ve yabani tür zeytin ağaçlarından alınan örneklerden ise 15 izolat olmak üzere toplamda 57 izolat elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Tüm bu izolatlardan, 47 adedi zeytin meyvesinden ve 10 adedi ise yaprak örneklerinden gelmektedir. Zeytin meyveleri, hem sağlam hem de hasarlı danelerden seçilmiştir. Hasarlı zeytinlerden izole edilen türlere bakıldığında 15 adet *Alternaria*, 4 adet *Penicillium* ve 2 adet *Aspergillus* olduğu görülmektedir. *Alternaria* cinsine ait türlerinin zeytin ağaçlarında patojenik semptomlara sebep olduğu bilinmektedir (Özkılınç ve ark., yayınlanmamış veri). Ayrıca, *Alternaria* türlerinin zeytin ağaçları üzerine bu etkisi literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde de görülmektedir (Bourpos ve ark., 1999; Piccolo ve ark., 2014). Bununla birlikte, *Penicillium* ya da *Aspergillus* cinsinin zeytinde patojenitesi bilinmemektedir. Fakat patojenitesi bilinmeyen fungusların da, kolayca kolonize olabildiği ve bitkisel dokulara zarar verdiği bildirilmektedir (Eltem, 1996). Diğer yandan, sağlam zeytin danelerinden sadece 4 *Penicillium* ve 2 *Aspergillus* izole edilmiştir. Bu durum, bazı fungal türlerin bariz hastalık oluşturmaksızın bulunabildiğini göstermektedir. Ayrıca, *Aspergillus* ve *Alternaria*'nın meyve üzerinde hastalık oluşturmamasına rağmen toksin üretme potansiyeli olabilir (Visconti ve ark., 1986; Leontopoulos ve ark., 2003). Tarla örneklemesinden izole edilen başlıca fungusların *Alternaria*, *Penicillium* ve *Aspergillus* olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Ek olarak, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Epicooccum*, *Phoma* ve *Clonostachys* fungal türleri de sık olmamakla birlikte tarla örneklemesinden izole edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, doğal bir çevrede yetişen zeytinlerde benzer çeşitliliğe sahip fungal türlerin bulunduğu bildirilmiştir. Örneğin, Chliyeh ve ark. (2014) tarafından Fas'da yetişen zeytin ağaçlarında yapılan bir örnekleme çalışmasında, *A. alternata*'nın örneklenen tüm bölgelerden izole edilen fungusların %13 ile %84,5 aralığında olduğu belirtilmiştir. Diğer bir arazi çalışması ise Carlucci ve ark. (2013) tarafından güney İtalya'da ki zeytin ağaçlarından gerçekleştirilmiştir. Örnekleme yapılan zeytin ağaçlarında, dallar ve daldaki kabuk kısımlarının altında kahverengi çizgi oluşumu, yaprak kahverengileşmesi gibi hasarlar olduğu bildirilmiştir. Hasarlı zeytin ağacı ve dallarındaki kahverengi çizgilerden izole edilen funguslardan, *A. alternata*, *Aspergillus spp.* ve *Penicillium spp.* izolasyon oranları sırası ile %3,3, %8,9 ve %5,4 olarak rapor edilmiştir (Carlucci ve ark., 2013). Portekiz'de zeytin ağaçlarından izole edilen fungusların toplamda %42 oranında *Alternaria*, *Penicillium* ve *Fusarium* türlerine ait olduğu, bunların



arasından en fazla izole edilen fungal örneklerin ise *Alternaria* olduğu bildirilmiştir (Oliveira ve ark., 2012). Baffi ve ark. (2012), *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin, zeytin meyveleri, zeytin prınası ve zeytin ezmesi gibi ürünlerde önemli fungal türler olduğunu bildirmiştir. Söz konusu tez çalışmasında baskın tür *Alternaria* iken Baffi ve ark., (2012) tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus* ve *Penicillium* olarak belirtilmiştir. Ayrıca, *Aspergillus niger* ve *Penicillium crustosum* izole edilen türler arasında en yaygın olanları olarak belirtilmiştir ki, bu türler bu tez çalışmasından elde edilen baskın *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri ile benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde, Al-Ameri ve ark., (2015), zeytin meyvesi güvesinden *A. niger* (%13 örnek sıklıkta) izole edildiğini rapor etmişlerdir. Diğer yandan, Roussos ve ark., (2006), Fas'ta zeytinyağı üretiminde *Aspergillus* ve *Penicillium*'un baskın flora olduğunu bildirmiştir ve *A. niger* en yaygın olanıdır. Tarla örneklemesinin tüm aşamalarında alınan örneklerden organik tarım-ilaçlı tarım, Ladoles-Edremit tipi ve örnek alınan lokasyonlar arasında elde edilen fungal izolatlar bakımından önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

Çizelge 4.2. Moleküler tanımlamada elde edilen fungal türler ve izole edilme sıklıkları

Kaynak	Fungal Türler										Diğer*	Toplam		
	<i>Alternaria</i>	<i>Penicillium</i>					<i>Aspergillus</i>			<i>Monascus</i>				
Tarla örneklemesi	Zeytin Danesi	<i>A. alternata</i>	35	3	1	1	1	1	3	-	-	-	10	57
		<i>Penicillium spp.</i>		6	4	-	-	-	1	3	-	3	1	26
		Lab-ölçekli Üretim Ticari Ürt.	5	6	4	-	-	-	1	3	-	3	1	26
Fermentasyon prosesi	Salamura	<i>A. alternata</i>	1	7	2	2	-	-	2	1	2	-	-	24
		<i>Penicillium spp.</i>		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
		Lab-ölçekli Üretim Ticari Ürt.	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Biofilm (Kefeke)	Biofilm Üretim Ticari Ürt.	<i>A. alternata</i>	-	6	3	-	-	-	-	3	-	-	2	23
		<i>Penicillium spp.</i>		1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	3
		Lab-ölçekli Üretim Ticari Ürt.	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	3
<b>Toplam</b>		<b>41</b>	<b>43</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>130</b>				

\* *Fusarium*, *Cladosporium Epicoccum*, *Phoma*, *Clonostachy*

#### 4.1.3. Laboratuvar Ölçekli Sofralık Zeytin Üretiminden İzole Edilen Fungal Flora

Doğal fermente sofralık siyah zeytin üretim sürecinde fermentasyonunun farklı aşamalarından alınan tüm zeytin meyve örneklerinden toplamda 23 fungal izolat, salamura örneklerinden toplamda 17 fungal izolat ve kefeke örneklerinden ise toplamda 17 fungal izolat elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

Tarla örneklemede, en yaygın türün *Alternaria* olarak belirlenmesine rağmen, sofralık siyah zeytin üretim sürecinde bu türe neredeyse hiç rastlanmamıştır. Bu durumun nedenini araştırmak amacıyla 100 ml'lik sterilize edilmiş salamura ortamına izole edilen *Alternaria*, *Penicillium* ve *Aspergillus* funguslarından 2'şer izolat aktarım yapılmıştır. Steril salamuralarda *Aspergillus* ve *Penicillium* başarı bir şekilde gelişirken *Alternaria*'dan aktarılan izolatların ise salamura ortamında gelişemediği gözlenmiştir. Bu durumun ise salamuranın yüksek tuz konsantrasyonu (~% 10) ve özellikle zengin fenolik bileşen içeriğinden (Çizelge 4.7) kaynaklandığı düşünülmektedir. Önceki çalışmalar, KCl ve NaCl'nin tarçın yağı ile birlikte kullanılmasının da *Alternaria alternata* türü üzerinde antifungal etki gösterdiğini belirtmektedir (Fhen ve Zheng, 2006). Ayrıca, zeytinlerdeki fenolik bileşiklerin antifungal etki gösterdiği de bilinmektedir (Pereira ve ark., 2007). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde mevcut antifungal etkinin *Alternaria* üzerine diğer fungal türlerden daha fazla etki gösterdiği düşünülmüştür. Bununla birlikte, *Alternaria* daha çok doğal ortamdaki zeytinler için hastalık etmenidir. Fakat, *Aspergillus* ve *Penicillium* tarladan sofralık zeytine mevcudiyetini korumaktadır. Dolayısı ile sofralık zeytin üretim sürecinde bu türlerin toksin üretip üretmediğinin belirlenmesi daha fazla önem taşımaktadır. Diğer yandan, sofralık zeytin üretimi için kullanılan hammaddenin sağlıklı olmayan danelerinin *Alternaria* toksinleri tarafından kontamine olup olmayacağı da cevaplanması gereken önemli bir soru işaretidir. Çünkü yapılan bir çalışmada *Alternaria* cinsinin sorumlu olduğu mikotoksinlerin zeytin danesinde tespit edildiği belirtilmektedir (Visconti ve ark., 1986).

Fermentasyon sürecinde baskın fungal florada, *Penicillium* (%49) ve *Aspergillus* (%20) türleri yer almaktadır. Bunların içerisinde %14 ile en yaygın tür *P. crustosum* olduğu tespit edilmiştir. Diğer yaygın türler ise, sırasıyla *P. roqueforti* (%4) ve *P. expansum* (%2)'dir. Bununla birlikte, *P. brevicompactum* ve *P. galabrum* fermentasyon sırasında izole edilmemiştir. *A. niger* ve *A. tubingensis* olmak üzere her iki *Aspergillus* türü de %7'lik bir frekans ile eşit oranlarda izole edilmiştir. Benzer şekilde, Şahin ve Korukoğlu (2000), salamura gıdalarda *Penicillium*'un baskın fungus olduğu rapor

edilmiştir.

Doğal fermente siyah zeytin üretimi ile ilgili Türkiye'de yapılmış önceki çalışmalarda, *P. roqueforti*, *P. brevicompactum* ve *P. citrinum*'un izole edildiği belirtilmiştir (Heperkan ve ark., 2006; Heperkan ve ark., 2013). Çalışmamızda ise CIT ve OTA üretim potansiyeline sahip olduğu bilinen *P. expansum* ve *A. niger* türleri de tanımlanmıştır. Adlouni ve ark. (2006) tarafından, aflatoksin, OTA ve CIT toksinlerinin perakende satıştan toplanan siyah zeytin örneklerinin bir kısmında bulunduğunu bildirilmiştir. Ghitakou ve ark. (2006) tarafından siyah ve yeşil zeytinlerde, doğal mikroflora ve *Aspergillus parasiticus* tarafından aflatoksin B1 ve OTA üretimi üzerine benzer sonuçlar rapor edilmiştir.

Laboratuvar ölçekli doğal fermente sofralık siyah zeytin üretiminden elde edilen fungal floranın yanında, Çanakkale il sınırları içerisinde faaliyet gösteren sofralık zeytin üreticisi 5 farklı işletmeden fermentasyon sürecindeki zeytin meyvesi ve kefeke örneklemelerinden elde edilen fungal florada *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Monascus*'a ait türlerin baskın olduğu belirlenmiştir. En yaygın türlerin ise *P. crustosum*, *A. tubingensis* ve *M. pilosus* olduğu tespit edilmiştir. *M. Pilosus*, tüm izolatların %10'unu oluşturmaktadır. Ayrıca, izole edilen *M. pilosus*' un çoğunluğunun zeytin danesi ve kefededen gelmesine rağmen, salamuradan hiç izole edilmemesi dikkat çekici bulunmuştur. Laboratuvar-ölçekli sofralık zeytin üretiminden elde edilen fungal flora ile ticari-ölçekli üretimden elde edilen fungal flora benzer olmakla birlikte izolat sayısı bakımından farklılık göstermektedir. Laboratuvar ölçekli üretimden *Monascus* izolatların sayısının (6 izolat), ticari üretime (2 izolat) kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2). *Monascus* fungal cinsi içerisinde yer alan *M. purpureus* ve bazı *M. pilosus* türleri Mon K toksin üreticisi olarak bilinmektedir (Su ve ark., 2003; Hong ve ark., 2011).

Literatürde sofralık zeytinin mikrobiyal florasının belirlenmesine yönelik ticari işletme örnekleme ve marketlerden yapılan örnekleme ile ilgili çalışmalar daha çok bakteri ve maya florasının tanımlanmasına yöneliktir (Alloya-Lopez ve ark., 2008; Idoui ve ark., 2008; Bautista-Gallego ve ark., 2011; Tofalo ve ark., 2013; Porru ve ark., 2018). Idoui ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, geleneksel fermantasyon yöntemi ile üretilmiş siyah zeytinin mikroflorasından izole edilen 17 laktik asit bakterisi, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* cinsleri olarak tanımlanırken *Lac. plantarum* baskın tür olarak belirtilmiştir. Diğer yandan, sofralık siyah zeytinlerde başlıca maya florasını *Candida boidinii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia anomala*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula glutinis* ve *Saccharomyces cerevisiae* türlerinin oluşturduğu bildirilmiştir (Alloya-Lopez ve

ark. 2008).

Sofralık zeytinin fungal florasının tanımlanmasına yönelik benzer çalışmalar da literatürde rapor edilmiştir (Burçak, 2001; Roussos ve ark. 2006; Bavaro ve ark., 2017; Medina ve ark., 2018). Örneğin, Roussos ve ark. (2006) tarafından, zeytinyağı işletmelerinden alınan zeytin prinası ve yabancı zeytin örneklerinden 285 fungus tanımlanmıştır. Bunların 167'sinin *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Geotricum*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Humicol* ve *Ulocladium* olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, bu tez çalışmasındaki bulgulara benzer şekilde *Penicillium* ve *Aspergillus* toplam izolatların %32,3 ve %26,9 ile en çok rastlanılan mezofilik fungal izolat olduğu tespit edilmiştir. Burçak, (2001) tarafından yapılan bir tez çalışmada İstanbul'da ki çeşitli marketlerden temin edilen sofralık siyah zeytin örneğinde *Penicillium* cinsi fungus izolasyonu ve tür tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, alınan örneklerde; *Penicillium crustosum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium roquefortii* ve *Penicillium digitatum* olduğu belirtilmiştir. Bavaro ve ark., (2017) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise fermente siyah zeytinlerden hem laboratuvar-ölçekli hemde işletme-ölçekli örnekler ile çalışılmış ve bu tez ile benzer ( $\beta$ -*tub* ve *ITS*) primerler kullanılarak tanımlama yapılmıştır. Yapılan tanımlamada elde edilen türlerin ise *Penicillium crustosum* (21 izolat), *P. roquefortii* (29 izolat), *P. paneum* (1 izolat), *P. expansum* (6 izolat), *P. polonicum* (2 izolat) ve *P. commune* (1 izolat) olduğu bildirilmiştir.

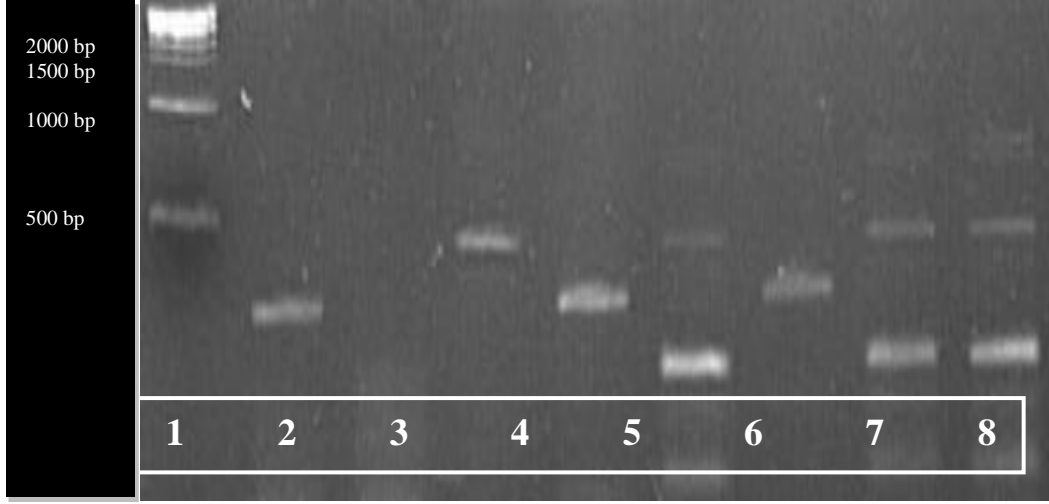
## **4.2. Fungal İzolatların Toksin Üretme Potansiyelleri**

### **4.2.1. Primer Tasarımı ve Fungal İzolatların Toksin Üretimi ile İlgili DNA Bölgelerinin Çoğaltılması**

Toksin üretimi ile ilgili DNA bölgelerinin belirlenmesinde öncelikli olarak, OTA ve CIT üretiminden sorumlu olduğu bilinen ve bu çalışma kapsamında da tanımlanan *P. expansum*, *A. niger* ve *M. pilosus* izolatlarından elde ettiğimiz sekans bilgileri temel alınmıştır. İzolasyon çalışmasında elde edilen türlerden OTA üretiminden sorumlu olduğu bilinen *A. niger*'dir (Dao ve ark., 2005). Aynı şekilde CIT üretim potansiyeline sahip *Penicillium* türü olan *P. expansum* izolatlar arasında yer almaktadır (Ballaster ve ark., 2015). Fakat, diğer izole edilen 4 tür (*P. glabrum*, *P. crustosum*, *P. brevicompactum* ve *P. roquefortii*) önceki çalışmalar incelendiğinde OTA ve CIT üretim potansiyelleri çoğunlukla negatif olarak belirtilmiştir (Ballaster ve ark., 2015; Runtberget ve ark., 2004; Kokkonen ve ark., 2004). *Monascus* fungal türü, Mon-K ve CIT üretiminden sorumlu olduğu önceki çalışmada belirtilmiştir (Hong ve ark., 2011). Bununla birlikte, CIT üretim

potansiyeli ise daha çok *M. purpureus* türü için rapor edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen *M. pilosus* türü için ise bazı çalışmalarda negatif sonuç belirtilirken bazı çalışmalarda az miktarda CIT ürettiği belirtilmiştir (Blanc ve ark., 1995; Pisareva ve ark., 2005). Elde ettiğimiz izolatlarda bu bölgedeki toksin genlerini kısmen çoğaltabilmek için materyal ve yöntem kısmında ayrıntılı bir şekilde verildiği gibi NCBI gen bankasında var olan önceki bilgilerden ve çalışma kapsamında elde edilen izolatların sekans verilerinden yararlanarak primerler sentezlenmiştir.

Toksin üreten genlerin tespiti için primer sentezlenmesi toksinin hızlı tespiti için kullanılabilen bir yöntemdir. Bu nedenle son yıllarda konu ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin, aflatoksin B1 geninin tespiti için yapılan bir çalışmada seçilmiş gıda mamullerinde aflatoksin genik fungusların PZR ile tespiti için *aflR1* primerleri dizayn edilmiştir (Manonmani ve ark., 2005). Benzer şekilde, Spadaro ve ark. (2011) tarafından üzüm salkımlarında *Aspergillus carbonarius*'un okratoksin A üreten izolatlarının saptanması için spesifik *AcPKS-F1/AcPKS-R1* primerleri sentezlenmiştir. CIT gen bölgesinin tespiti için ise Shimitzu ve ark. (2005)'nin yaptığı bir çalışmada, bir fungal primerin domain ketosentazının korunmuş bölgesinin amplifikasyonundan sentezlenmiş primerler ile *M. purpureus*'dan *PKS* geni klonlamıştır. Sonuç olarak *pksCT* transkripsiyonu CIT üretimi ile korelasyon göstermiş ve bu da *pksCT* gen ürününün CIT biyosentezinde yer aldığı şeklinde yorumlanmıştır. Literatürdeki benzer çalışmalar incelendiğinde, PZR temelli izlenilen yöntemin bu çalışmada olduğu gibi poliketitsentaz gen bölgesi üzerinden yola çıkılarak NCBI gen bankasındaki verilerin kullanılmasıyla primerin sentezlenmesi olduğu görülmektedir (Hayat ve ark., 2012). Bu çalışmada dizayn edilen primerler (Çizelge 4.3) kullanılarak tüm fungal izolatlar için PZR gerçekleştirilmiştir. *Penicillium* türleri için elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki elektroforez görüntüleri Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.2. *Penicillium* izolatları için *PE\_cit* primeri ile çalıştırılan PZR reaksiyonunun %2,5 agaroz jelde elektroforez görüntüsü (1-2-6: *P.crustosum*, 3: *P.roquefortii*, 5-7: *P.expansum*, 8: *P.glabrum*)

Şekil 4.2'de görüldüğü gibi primerler ile bazı izolatlar pozitif reaksiyon verirken bazıları ise negatif reaksiyon ile sonuçlanmıştır. İzole edilen her bir tür için sentezlenen primerlerin verdiği reaksiyon sonuçları ise Çizelge 4.3'de verilmiştir. Buradan, sentezlenen primerlerin, sadece sentezlenen fungal türde PZR pozitif sonuç verdiği anlaşılmaktadır. *PE cit F/ PE cit R* primerinin tek bir *A.niger* izolatında pozitif sonuç vermesi istisna tutulursa, tüm primerler *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Monascus* türlerinin yalnızca birinde pozitif sonuç vermiştir.

Dao ve ark., (2005) tarafından, *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 için *PKS* geninin bir DNA dizisinden iki PZR spesifik primer çifti (*AoLC35-12L / AoLC35-12R* ve *AOOTAL / AoOTAR*) tasarlanmıştır. Tasarlanan bu primerler, 14 farklı fungal tür üzerinde test edilmiştir. *AoLC35-12L/AoLC35-12R* primer çiftinde OTA ve CIT üreten funguslarda bant elde edilebiliyorken, *AOOTAL / AoOTAR* primer çiftinde sadece *A. ochraceus* için olumlu sonuç alınmıştır. Bu çalışmadan yola çıkarak *AoLC35-12L/AoLC35* primer çifti temin edilmiş ve tüm türler için denenmiştir. Fakat, *Penicillium* ve *Monascus* türlerinin tamamında negatif sonuç verdiği görülmüştür. İzolasyonda elde edilen 19 adet *Aspergillus* türü bulunmaktadır. Bunlardan 8 adet *A. niger*, 5 adet *A. tubingensis*, diğerleri tür bazında tespit edilemeyenlerdir. *A. niger*'lerin sadece 5 tanesi ile mevcut primer çifti kullanılarak pozitif PZR ürünü veren bant elde edilebilmiştir. *A. tubingensis*'ten bu primer ile PZR ürünü elde edilememiştir. OTA üretimi için dizayn edilen primer (*An\_OTA*) olup, *A. niger*'e ait sekans verileri kullanılarak hazırlanmıştır. Dizayn edilen bu primer ile 8 adet *A.*

*niger* izolatından 6'sı pozitif sonuç verirken, *A. tubingensis*'in izolatlarının 8 adedinden 3'ünde pozitif sonuç verdiği görülmüştür.

Çizelge 4.3. Sentezlenen primerlerin PZR reaksiyonlarının sonuçları

Fungal İzolatlar	PZR Reaksiyonu (Primer çifti)*			
	<i>AoLC35-12L/</i> <i>AoLC35-12R</i>	<i>AN_OTA-F/</i> <i>AN_OTA-R</i>	<i>PE_cit-F/</i> <i>PE_cit-R</i>	<i>M_cit-F/</i> <i>M_cit-R</i>
<i>A. alternata</i>	-	-	-	-
<i>P. crustosum</i>	-	-	3/11	-
<i>P. glabrum</i>	-	-	1/1	-
<i>P. roquefortii</i>	-	-	1/4	-
<i>P. expansum</i>	-	-	2/2	-
<i>P. brevicompactum</i>	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	5/8	6/8	1/8	-
<i>A. tubingensis</i>	-	3/5	-	-
<i>M. pilosus</i>	-	-	-	5/8

\*Çizelge 3.3'de baz dizimi verilmiş primerler ile çalıştırılmış PZR reaksiyonu sonucu bant elde edilen izolatların sayısı ("-" : Tüm izolatların negatif reaksiyon verdiği durumu ifade etmektedir.)

Poliketitsentaz geninin fonksiyonel karakterizasyonu ile ilgili yapılmış iki çalışmadan birinde *Aspergillus ochraceus*'da OTA biyosentezi için gerekli olan *PKS* geni (O'Callaghan ve ark., 2003), diğerinde ise *Penicillium verrucosum* fungusunda OTA biyosentezinden sorumlu olan *PKS* geni (O'Callaghan ve ark., 2013) araştırılmıştır. *A. ochraceus* fungal türünde, OTA sentezi amacıyla gerçekleşen *pks* gen ekspresyonu PDA veya ME (Malt Extract) sıvı besiyeri gibi OTA üretimini baskılayıcı bir ortamda gerçekleşmezken, YES agar veya maya ekstrası veya MC (Casamino asit) içeren Czapek-Dox sıvı besiyeri gibi OTA üretime izin veren ortamda ise ekspresyonun gerçekleştiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, OTA sentezine izin veren besiyeri ortamında gerçekleşen *pks* gen ekspresyonu sadece mikotoksin üretiminin erken aşamalarında olmuştur (O'Callaghan ve ark., 2003). Diğer yandan, O'Callaghan ve ark. (2013) tarafından, *pks* gen transkripsiyonunun, fungal kültürlerin gelişim ortamında farklı karbon kaynakları kullanılarak düzenlenebildiği bildirilmiştir. Gliserol ve galaktoz eklenen MCB (MC içeren Czapek-Dox sıvı besiyeri) ortamında geliştirilen *Penicillium verrucosum* tarafından OTA üretiminde sırasıyla 19 ve 32 kat artış gözlenmiştir (O'Callaghan ve ark., 2013). Ayrıca,



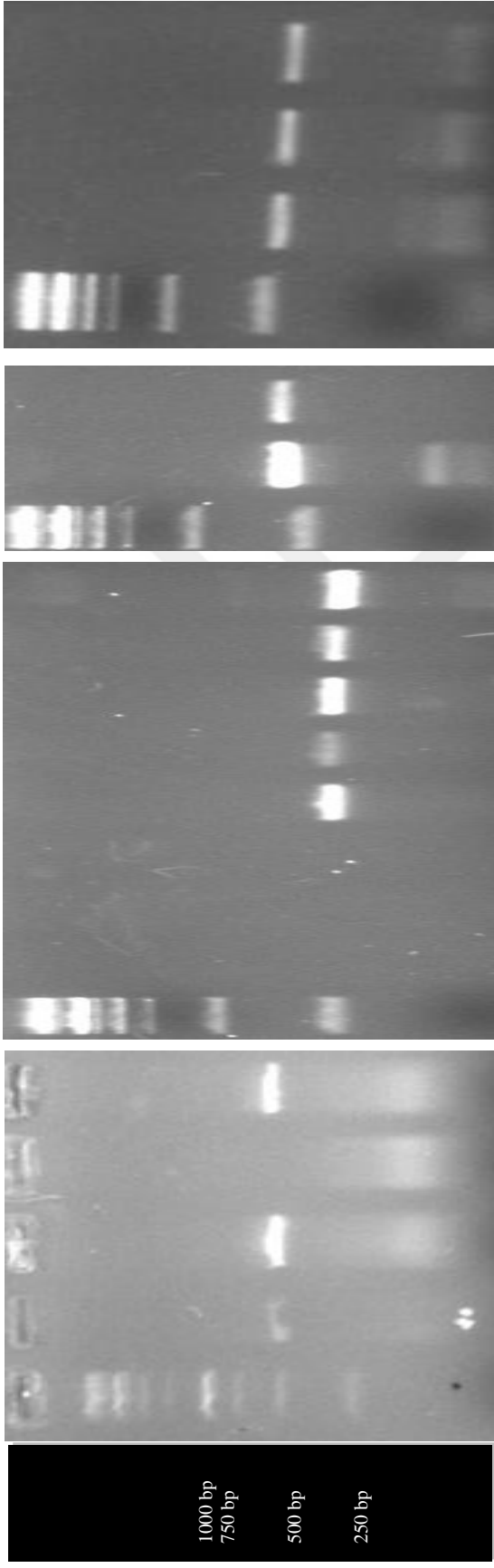
OTA *pks* gen ekspresyonu, çeşitli besin kaynaklarının dışında pH, sıcaklık, su aktivitesi ve koruyucu madde varlığı, ışık ve inkübasyon süresi gibi çeşitli çevresel stres faktörlerinden de etkilenmektedir (Geisen ve ark., 2004; Schmidt-Heydt ve ark., 2007; Abbas ve ark., 2009; Munoz ve ark., 2011). Castella ve Cabanes (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise gerçek zamanlı-PZR ile *A. niger* fungusunda OTA üretimi tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla elde edilen primer başka fungal türler ile de denenmiş ve *A. tubingensis*'de negatif sonuç verdiği rapor edilmiştir. *An-OTA* primeri *Aspergillus* hariç hiçbir izolatta pozitif sonuç vermemiştir. Farklı okratoksijenik *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından kahve ve buğday bazlı medikasyonlarda mikotoksin üretimi üzerine yapılmış bir çalışmada ise dört farklı okratoksijenik fungusun (iki adet *Aspergillus* ve iki adet *Penicillium*) OTA üretimi, dört farklı ortamda (buğday ve kahve modeli ortamında ve iki standart laboratuvar ortamında) incelenmiştir. MEA (Malt Ekstrak Agar) ve YES agarın kullanılarak 2, 4 ve 8'er gün 25 °C' de inkübasyona bırakılan petrielerde toksin üretimleri ince tabaka kromatografisi (TLC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri ile incelenmiştir. İncelenen tüm fungus kolonilerinin iyi gelişimine rağmen MEA ortamında OTA üreten tek suşun *A. niger* (BFE632) olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda OTA üretiminin zamanla arttığı ve koloni yüzeyinde eksudasyon damlacıkları olan fungal kültürlerde OTA üretiminin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Munoz ve ark., 2011).

CIT üretim potansiyelini belirlemek amacı ile sentezlenen primer (*PE\_cit*) *Penicillium* türlerinin 7'inde pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.3). *Penicillium* türleri, ılıman ve soğuk iklimli bölgelerde OTA üreticisi olarak bilinirler (Krogh 1992; Munoz ve ark., 2011). Tuz içeriği bakımından zengin proteinli gıda ürünlerinde ise *P. nordicum* en baskın okratoksijenik türdür (Larsen ve ark., 2001; Munoz ve ark., 2011). Belirlenen türler arasında literatürde CIT sorumlusu olarak en çok konu edilen *P.expansum*'un iki izolatu da pozitif reaksiyon vermiştir. Ballester ve ark. (2015), bir poliketit sentazı kodlayan *pksCT* geninin ekspresyonu CIT kümesinde (cluster) analiz edilmiştir.  $\Delta pksCT$  mutantlarının patojenitesi kontrollü koşullar altında, aşılınmış elma meyveleri üzerinde değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında elde edilen 8 *Monascus* izolatının 5'i, CIT üretim potansiyeline sahip gen bölgesinin kısmi amplifikasyonu yapılmıştır. *Monascus* fungusları Mon K üretimi açısından daha fazla literatür bilgisine sahiptir (Lee ve ark., 2006; Hong ve ark., 2011). Bununla birlikte bazı kaynaklarda CIT üretimi pozitif olarak belirtilmiştir (Pisareva ve ark., 2005; Lee ve ark., 2006). Bunun tersine, Hong ve ark. (2011) tarafından yapılan *M.*

*pilosus* ile fermente edilen kırmızı ginsengde, deglikolize edilmiş ginsenoidlerin ve Mon K'nın zenginleştirilmesi ile ilgili bir çalışmada, kullanılan *M. pilosus* izolatlarının CIT üretmediği bildirilmiştir.

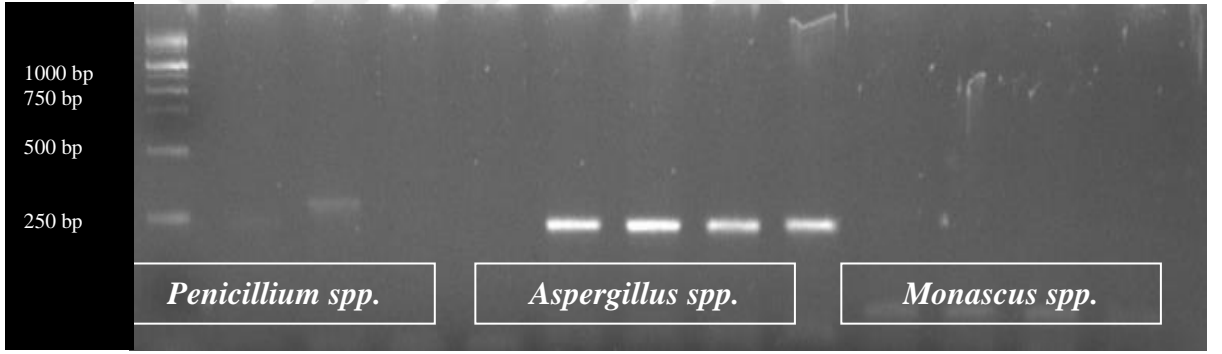
Çalışmanın devamında *Penicillium* izolatlarının birçok türünde, *PE\_cit* primerinin pozitif sonuç vermesi, sekans analizine gerek kalmadan mevcut primer ile tür bazında tanımlanabilmesini akla getirmiştir. Bu amaçla, tüm *Penicillium* izolatları *PE-Cit* primeri ile PZR reaksiyonuna tabi tutulmuş ve elde edilen PZR ürünü %2,5 agaroz jelde bantlara ayrılmıştır. Bant ayırımında, tür bazında ayrı büyüklükte bant elde edildiği gözlemlenmiştir. Fakat, denemenin yapılmasındaki amaç, bu çalışmada sentezlemiş olduğumuz primeri kullanarak *Penicillium* türlerinin tek primer ile sekans analizine gerek kalmadan tanımlanabilmesi iken, elektroforez görüntüsünde bazı türlerin aynı baz büyüklüğünde ürün verdiği tespit edilmiştir. Örneğin, *P. expansum* ve *P. glabrum* türlerinin baz büyüklüğü, elektroforez görüntüsünde ayırt edilemeyecek kadar benzerdir. Dolayısı ile bu denemenin amacı başarılı olamamıştır. Fakat sentezlenen bu primerlerin, başka çalışmalarda tanımlanmış türlerin varlığı ile ilgili bilgi vermesi amacıyla kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir.



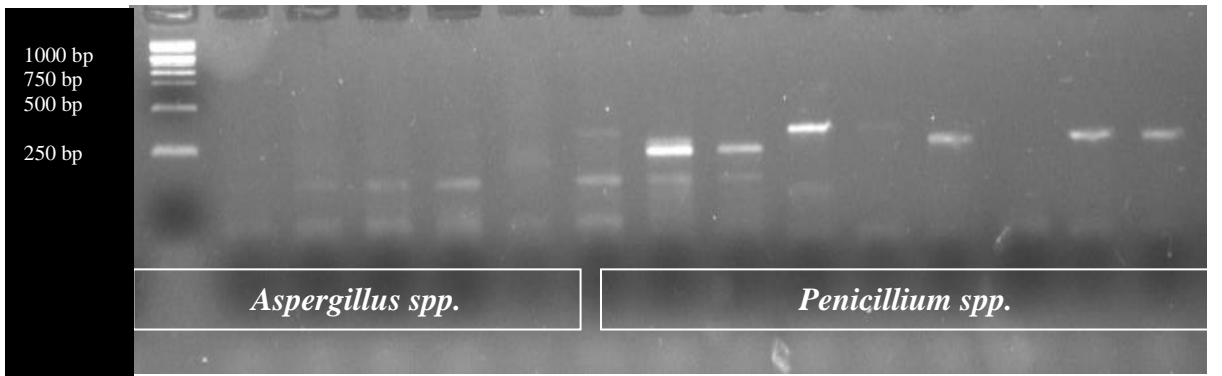
Şekil 4.3. Tasarlanan primerlerin PZR reaksiyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri (a) *AoLC35-12* (*A.niger*~500 bç) (b) *AN\_OTA* (*A.niger* ~250 bç); (c) *PE\_cit* (*P.expansum*~250 bç); (d) *M\_cit* (*M.pilosus*~250 bç)

#### 4.2.1.1. Multipleks PZR Reaksiyonu

Primerler ile çalıştırılan PZR reaksiyonlarından farklı baz büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmesinden yararlanılarak multiplex PZR reaksiyonu denemesi yapılmıştır. Multiplex PZR reaksiyonu ile bir protokolda birden fazla toksin üretme potansiyeline sahip türün tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, primerlerin 2'li ve 3'lü karışımları ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonundan elde edilen bantlar Şekil 4.4'de gösterilmektedir. Şekil 4.4(a) incelendiğinde *AN\_OTA* ve *PE\_cit* primer çiftleri ile yürütülen multiplex PZR reaksiyonunda yalnızca *Aspergillus* türleri pozitif sonuç vermiştir. Aynı şekilde Şekil 4.4(b) incelendiğinde üç primer kombini (*AN\_OTA*; *PE\_cit*; *M\_cit*) ile yürütülen PZR reaksiyonunda türlerden yalnızca *Penicillium* türlerinin pozitif sonuç verdiği diğer türlerde başarılı olmadığı gözlemlenmiştir. Multiplex PZR reaksiyonlarından sonuçlarından, primerlerin farklı PZR protokollerine ihtiyaç duyması sebebi ile ortak protokol geliştirilememiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.4. Multipleks PZR reaksiyonunun elektroforez görüntüsü (a) *AN\_OTA* ve *PE\_cit* primer çiftleri ile yürütülen multiplex PZR reaksiyonu (b) üç primer kombini (*AN\_OTA*; *PE\_cit*; *M\_cit*)

Multiplex PZR çalışmaları ve sentezlenen primerlerin tanımlama amacı ile kullanılması moleküler biyolojinin önemli konularından biridir. Multiplex PZR, fungusların toksin üretme potansiyellerini belirleme konusunda kullanılması ile ilgili literatürde çalışmalara rastlanmaktadır (Kim ve ark., 2011; Ramana ve ark., 2011).

Aflatoksin, dünya genelinde daha çok bilinen ve çalışılan toksin türü olduğundan bu konu ile ilgili literatür bilgileri de genellikle aflatoksin tanımlanması üzerinedir. Örneğin, Kim ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada soya fasulyesinin fermentasyon başlatıcısı olarak kullanılan bir ürünlerdeki (meju) aflatoksijenik ve non-aflatoksijenik fungusların tespiti için Multiplex-PZR analizleri yapılmıştır. Çalışmada, aflatoksin biyosentez kümesinde bulunan *omtB*, *ver-1*, *aflR* ve *omtA* genleri için özel olarak iki farklı "üçlü primer seti" tasarlanmıştır. Multiplex-PZR koşulları optimize edildiğinde, sadece aflatoksigenik *Aspergillus* türlerinin her iki primer setinde de üç bant verdiği görülmüştür (Kim ve ark., 2011). Yine, Ramana ve ark. (2011) tarafından Güney Hindistan'dan toplanan pirinç ve darının mikotoksigenik *Fusarium* türleri ile kontaminasyonu tespit etmek için, çok boyutlu PZR tabanlı strateji üzerine bir araştırma yapılmıştır. Bu amaçla, *Fusarium* türlerinin fumonisin ve trikotesen üreten suşlarının tespiti için bir multiplex-PZR çalışması tasarlanmıştır. Gruba özgü tespit yapabilmek için primerler, trikotesen biyosentezi ile ilgili *tri5* ve *tri6* genlerinden ve fumonisin biyosentezinde rol oynayan *fum1* and *fum13* genlerinden dizayn edilmiştir. Test edilen *Fusarium* türlerinin, trikotesen analizi için pozitif, fumonisinlerde ise 20 PZR pozitif kültürden HPLC analizinde sadece 13'ü pozitif çıktığı bildirilmiştir.

### **4.3. İzolatların Toksin Üretimi ve Zeytin Fermentasyon Sürecinde Toksin Varlığı**

#### **4.3.1. Kültür Ortamından (*in vitro*) Toksin Analizi**

Çalışmada, elde edilen izolatların toksin üretme potansiyeli moleküler yöntemlerle belirlenmiştir. Fakat, önceki çalışmalardan mevcut fungusların toksini üretip üretmemesinde sıcaklık ve nem gibi çevre şartları, gıdanın içeriği, bekleme süresi, pH ve ışık gibi faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Munoz ve ark., 2011). Bu nedenle çalışmanın devamında mevcut izolatlar besiyeri ortamında inkübe edilerek toksin üretip üretmedikleri kromatografik bir yöntem (HPLC metodu) ile kontrol edilmiştir. Koşullar sabit tutulmuş olup izolatlar herhangi bir stres ortamına bırakılmamıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'da gösterilmektedir. Elde edilen kromatogram görüntüsünün örneği ise Ek:1 ve Ek 2'de gösterilmektedir. Validasyonu gerçekleştirmek ve analizin çalışmasını

kontrol etmek amacıyla petrilerden bazılarında standart olarak kullanılan toksinlerle kontamine edilerek HPLC ile analiz yapılmıştır. Kromatogram görüntüleri ise Ek.3 ve Ek.4'de verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde toksin üretme potansiyeline sahip bazı izolatların toksin üretmediği görülmektedir. Örneğin *A. niger*'in OTA üretiminden sorumlu olduğu önceki çalışmalardan bilinmektedir. Bu çalışmada da elde edilen izolatların 6 tanesi üretim potansiyeli ile ilgili analizlerde pozitif sonuç vermiştir. Fakat, YES agar ortamında 25°C'de 7 gün inkübe edildiğinde, sadece bir tanesinin OTA ürettiği gözlenmiştir. Bunun bulunduğu ortam koşulları ile ilgisi olduğu düşünülmektedir. Başka bir çalışma kapsamında mevcut izolatların farklı koşullarda verdiği sonuçların incelenmesi tavsiye edilmektedir. Çalışmada analiz metotunu referans aldığımız Bragulat ve ark. (2001), saf kültürden OTA üretimini gözlemlemek amacıyla yaptığı çalışmada farklı besiyerleri kullanılarak *Aspergillus*'un birçok türüne (*A. niger*, *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. carbonarius*) OTA analizi uygulamıştır. Bragulat ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada kullanılan YES agar'ın özellikle *A. niger* türlerinin okratoksin üretimine oldukça elverişli olduğu sonuçlardan görülmektedir.

Okratoksin üretiminde sorumlu olduğu tespit edilemeyen *P. roquefortii*'nin 3 izolatı, *P. crustosum*'un 3 izolatı, *P. expansum*'un 1 izolatının besiyerinde OTA tespit edilmiştir. Toksin üretim mekanizmasının birçok faktörden etkilendiğini daha önce de belirtilmiştir. *P. crustosum*, genel olarak literatürde OTA ve CIT üretiminden sorumlu olan *Penicillium* türleri arasında belirtilmemektedir (Bogs ve ark., 2006). Fakat, *P. crustosum*'un da OTA üretebildiğini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur (Geisen ve ark., 2006; Vega ve ark., 2006). Örneğin, Vega ve ark., 2006 tarafından kahveden izole edilen *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. olsonii* and *P. oxalicum*'un OTA ürettiği bildirilmiştir.

Sofralık siyah zeytinlerde raslanılan en yaygın fungal türler; *P. crustosum*, *P. roquefortii*, *P. viridicatum* ve *P. verrucosum* olarak bilinmektedir. Bununla birlikte *P. expansum* ve *P. citrinum* da bulunmuştur. *P. expansum*'un CIT üreticisi olduğu bilinmektedir (Oral ve Heperkan, 1999; Şahin ve ark., 1999; Karaca, 2008). CIT üretiminden sorumlu *P. expansum* ve *M. pilosus* beklendiği şekilde YES agar besiyeri ortamında CIT üretmiştir. *P. expansum* CIT üretiminden sorumlu olmasıyla ilgili *P. citrinum* ile birlikte literatürde en fazla bilgi olan türlerden biridir. Fakat, tüm mikotoksinlerde olduğu gibi üretimi ortam koşullarına bağlıdır. Bu çalışmada izole edilen iki *P. expansum*'dan biri hem PZR, hem de HPLC toksin çalışmasında pozitif sonuç verirken diğeri toksin üretim potansiyeli olmasına rağmen HPLC analizi için hazırlanan

ortam koşullarında (YES agar/25°C/7gün) negatif sonuç vermiştir. Konu ile ilgili peynirlerde yapılan bir çalışmada *P. expansum*'un bazı örneklerde toksin üretirken bazılarında üretmediği belirtilmiştir (Bailly ve ark., 2002). OTA ile benzer şekilde *P. crustosum*' un 2 izolatu ve *P. roquefortii*'nin 3 izolatu besiyeri ortamında CIT üretmiştir. Bu türler literatürdeki birçok kaynakta OTA ve CIT üretiminden sorumlu gösterilmemiştir. Fakat sınırlı birkaç kaynakta OTA ve CIT üreten türler arasında ismi geçmektedir (Oruç, 2006; Nizamlioğlu ve Çon, 2010; Tokuşoğlu ve ark., 2010).

Çizelge 4.4. *In vitro* ortamda toksin analizi sonuçları

Fungal İzolatlar	Mikotoksinler (A/B)*	
	OTA	CIT
<i>P. crustosum</i>	3/11	2/11
<i>P. glabrum</i>	0/1	0/1
<i>P. roquefortii</i>	3/4	3/4
<i>P. expansum</i>	1/2	1/2
<i>P. brevicompactum</i>	0/1	0/1
<i>A. niger</i>	1/8	0/8
<i>A. tubingensis</i>	0/5	0/5
<i>M. pilosus</i>	0/8	5/8

\* (A/B): A-belirtilen *in vitro* koşullarda yapılan toksin analizinde toksin (+) sonuç elde edilen izolat sayısını ifade etmektedir; B- Çalışmada söz konusu türe ait elde edilen izolatların toplam sayısını göstermektedir.

*M. pilosus*'un CIT üretme potansiyeline sahip olduğu fakat bazı çalışmalarda negatif bazı çalışmalarda ise pozitif sonuçların bildirildiği bölüm 4.2.1'de açıklanmıştır. Benzer sebeplerden dolayı HPLC ile toksin analizinde *Monascus* izolatlarından bazıları CIT ürettiği gözlemlenirken bazıları üretmemiştir. 8 *Mon. pilosus* izolatından CIT üreten 5 izolat toksin geni belirleme çalışmasında gen varlığının pozitif çıktığı izolatlardır. OTA varlığı ise beklendiği gibi hiçbir *Monascus* izolatında görülmemiştir. *Monascus* izolatlarının CIT üretme potansiyeli ile ilgili yapılmış önceki çalışmalarda da CIT varlığının olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur (Pisareva ve ark., 2005; Tsukahara ve ark., 2009; Wang ve ark., 2005). Örneğin, Pisareva ve ark., 2005 tarafından yapılan bir çalışmada *M. pilosus* funguslarından bir tanesinde CIT üretimi 63 µg/ml olarak tespit edilirken diğerinde CIT varlığına rastlanmadığı bildirilmiştir.

Toksin üretme potansiyeli pozitif olan izolatların izole edildiği noktalardan kefeke dikkat çekicidir. OTA üretim sorumlusu olan *A. niger* ve CIT üretim sorumlusu

*Penicillium* türlerinin, en fazla kefeke oluşum dönemindeki izolatlardan geldiği belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda market çalışmalarından (Heperkan ve ark., 2009; Tokuşoğlu ve ark., 2010), toksin pozitif örnek sayısının daha fazla olduğu göz önünde bulundurulursa, bu durumun işletmelerin genel hijyen uygulamalarındaki eksikliklerin ve kantaminasyon olasılığının yüksek olduğunu düşündürmektedir.

İzole edilen funguslardan yapılan HPLC ile toksin analizinde elde edilen verilerden OTA üreten izolatların toksin üretimi 0,12-89,12 ppb aralığında bulunmuştur. CIT üreten fungal türlerin ise 3,06-784,31 ppb aralığında toksin üretimi olduğu belirlenmiştir. Bu toksin değerleri üzerine ortam sıcaklık koşullarının ve inkübasyon süresinin yanında özellikle kullanılan besiyerinin büyük önemi olduğu bilinmektedir. Örneğin, *Penicillium*'un CIT üretimi ile yapılmış bir kantitatif çalışmada, YES agar ve CYA agarda geliştirilip analiz edilen izolatların birbirinden neredeyse 1/10 oranında farklı sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir (Castella ve ark., 2002). İzolatlar arasında miktar bakımından en fazla OTA üreten tür *A. niger* iken, en fazla CIT üreten türün ise *P.expansum* olduğu belirlenmiştir.

#### **4.3.2. Fermantasyon Ortamından (*in vivo*) Toksin Analizi**

Üretilen sofralık siyah zeytinin 1. gün, 120. gün, 240. gün ve 18. aylarında örnekleme yapılarak HPLC yöntemi ile toksin analizi gerçekleştirilmiştir. İlgili kromatogramlardan analiz verileri değerlendirildiğinde, örneklerin hepsinde OTA ve CIT toksinlerine ait pikler gözlenmemiş olup, kantitatif olarak OTA ve CIT toksin varlığı tespit edilememiştir. Ülkemizde tüketimi oldukça yaygın olan bir gıda maddesinde toksin bulunmaması sonucu sevindirici olması ile birlikte doğrulanması açısından gerekli tüm kontamine örnekle doğrulama, yöntemin verimini hesaplama gibi yöntemlerle sonucun sağlanması yapılmıştır. Elde edilen kromatogram görüntüsü Ek 5'de gösterilmektedir. Kontamine örneklerin ve standartların kromatogram görüntüleri ise Ek 6, Ek 7 ve Ek 8'de verilmiştir.

Sofralık zeytinde toksin varlığı ile ilgili çalışmalardan bazılarında pozitif sonuçlar rapor edilmektedir (Heperkan ve ark., 2006; Tokuşoğlu ve ark., 2010). Bu tez çalışmasında elde edilen negatif sonuç ise literatürdeki bu çalışmalarla farklılık göstermektedir. Örneğin, ülkemizde yapılan iki araştırmanın birinde (Heperkan ve ark., 2006), Marmara ve Ege bölgelerindeki siyah sofralık zeytinlerden örnekleme yapılmış ve elde edilen küfler tanımlanmıştır. Marmara bölgesinden en çok *P. crustosum*, Ege bölgesinden ise en çok *P. roquefortii* tanımlandığı belirtilmiştir. Tanımlanan fungal flora bu çalışma ile benzerlik



gösterse de, bu çalışmada alınan örneklerin Marmara bölgesinde %81'inde ve Ege bölgesinde ise örneklerin %74'ünde CIT'e rastlanmadığı belirtilmiştir.

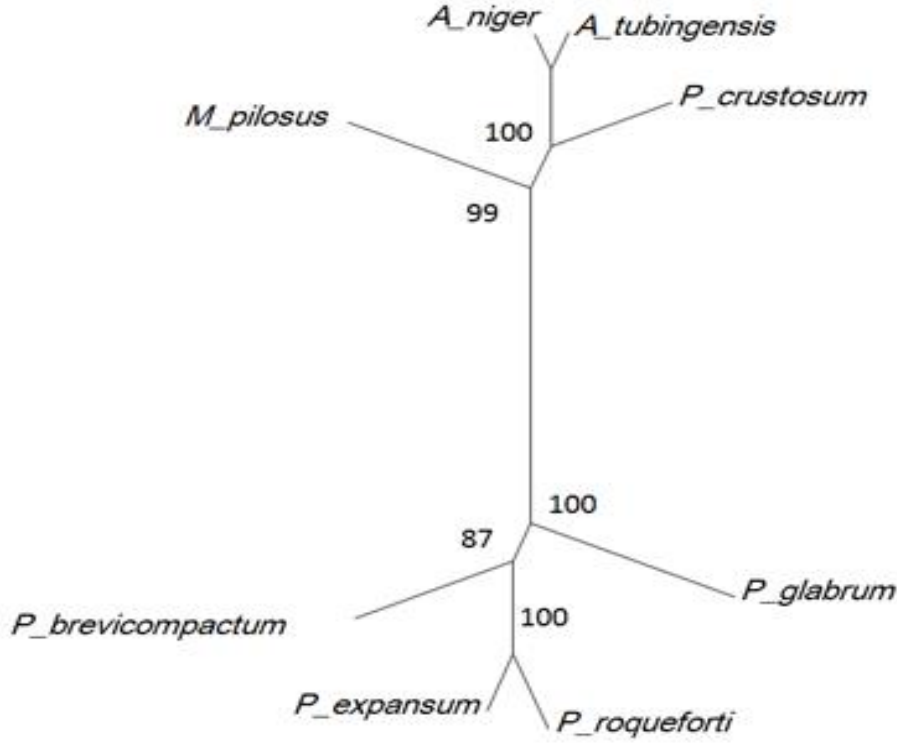
Tokuşoğlu ve ark. (2010) yılında yapılan bir çalışmada, siyah ve yeşil sofralık zeytinlerde CIT riskinin belirleyebilmek amacıyla 63 siyah zeytin ve 25 yeşil zeytin örneği alınmıştır. Örnekleme lokasyonları ise Balıkesir'in Edremit ilçesinden başlayarak Marmara ve Ege bölgesindeki zeytin ağaçlarıdır. Elde edilen sonuçlarda siyah sofralık zeytinlerin sırası ile %63'ünde ve %47'sinde CIT olduğu belirtilmiştir. OTA ise daha yüksek oranda bulunmuştur. Marmara bölgesinden elde edilen örneklerin %94'ünde Ege bölgesinden elde edilen örneklerin ve %92'sinde okratoksin kontaminasyonu belirtilmiştir. Yapılmış iki çalışmanın da market çalışması olması dolayısı ile üretim koşullarının birbirinden farklı ve daha fazla miktarlarda üretim ile elde edilmesi, söz konusu tez çalışmasında ise laboratuvar koşullarında üretilen ve salamurası değiştirilmeyen sofralık zeytinde fungal floranın zenginliğinin ve yükünün daha az olduğu çıkan sonuçlar arasındaki farklılıkların bu sebeplerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Dünya'da yapılan çalışmalarda da benzer şekilde toksin varlığına azda olsa rastlandığı belirtilmektedir. Toksin üretiminin ortam koşullarından çok fazla etkilenmesinin en güzel örneklerinden biri Yunanistan da yapılmış iki araştırmadır. Aynı ülkede 2 yıl ara ile zeytin ve zeytinyağında okratoksin varlığı ile ilgili yapılmış araştırmalardan birinde kontaminasyon %6,7 çıkarken, diğerinde ise %88 olduğu bildirilmiştir (Papachristou ve ark., 2004; Ghitakou ve ark., 2006; Karaca, 2008). Yine Yıldırım (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada, sofralık siyah zeytinde aflatoksijenik küf gelişimi ve aflatoksin oluşumuna *Lactobacillus plantarum* ve bazı bitki ekstraktlarının etkileri araştırılmış, aflatoksin miktarları belirlenebilirlik limitlerinin altında kaldığından hesaplanamadığı bildirilmiştir. Söz konusu tez çalışmasının ve literatürdeki diğer toksin çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde toksin üreten fungal türlerin toksin üretme potansiyeline sahip olsalar dahi ortam koşullardan etkilenmeleri sebebi ile farklı sonuçlar verdiği görülmektedir.

#### **4.4. Toksin Oluşturan İzolatların Genetik Benzerlikleri**

DNA bazlı filogenetik ağaç çalışmalarında, nükleotit sekans verileri karşılaştırılarak benzerlik ve farklılıklar gösterilir. Sekans verileri arasındaki uyum filogenetik ağaç dallarının uzunluğu ile ters orantılı olacak şekilde hazırlanır. Evrimsel yakınlık sekanslardaki uyumu, uzaklık ise sekanslardaki farklılığı göstermektedir (Haliki, 2016). Toksin üretme potansiyeline sahip izolatların genetik yakınlık-uzaklık özellikleri,  *$\beta$ -tubulin*

geninin kısmı baz dizilim verileri kullanılarak Nj (Neighbor joining) ağacı üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.5). Her bir türe ait izolatlar kendi içinde monomorfik olduğundan, her türe ait bir örnek kullanılmıştır.



Şekil 4.5. Toksin üreten izolatların genetik benzerlik dendogramı ve Bootstrap değerleri

Şekil 4.5'de verilen dendogram incelendiğinde iki ana grubun oluştuğu görülmektedir. Bunlardan *Penicillium* türleri (*P. crustosum* hariç) bir grubu, *Aspergillus* türleri ise diğer bir grubu oluşturmaktadır. Buna ilaveten, *M. pilosus* ve *P. crustosum* türlerinin de *Aspergillus* grubuna yakın olduğu görülmektedir.

Önceki çalışmalar incelendiğinde filogenetik ağaç çalışmalarının zeytinden izole edilen funguslar dahil birçok canlı türünde yapıldığı görülmektedir (Cheeseman ve ark., 2014; Bavaro ve ark.,2017). Bavaro ve ark. (2017) tarafından zeytinden moleküler yöntemlerle tanımlanan fungal izolatların benzerlikleri filogenetik ağaç oluşturularak belirlenmiştir.  $\beta$ -*tub* ve *ITS* primeri ile yapılan tanımlama çalışmasından elde edilen veriler UPGMA methodu kullanılarak analiz edilmiş ve izolatların > %99 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Diğer yandan, peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan *Penicillium* (*P. roquefortii* ve *P. camemberti*) türlerinin, penisilin üreticisi ve gıda bozulmalarına sebep

olan diğer *Penicillium* genomları (*P. chrysogenum*; *P. digitatum*) ile benzerliklerine yönelik filogenetik analizlerden yararlanılmıştır (Cheeseman ve ark., 2014).

#### **4.5. Sofralık Siyah Zeytin Üretim Sürecinde Mikrobiyal Yük ve Kimyasal Parametrelerdeki Değişimler**

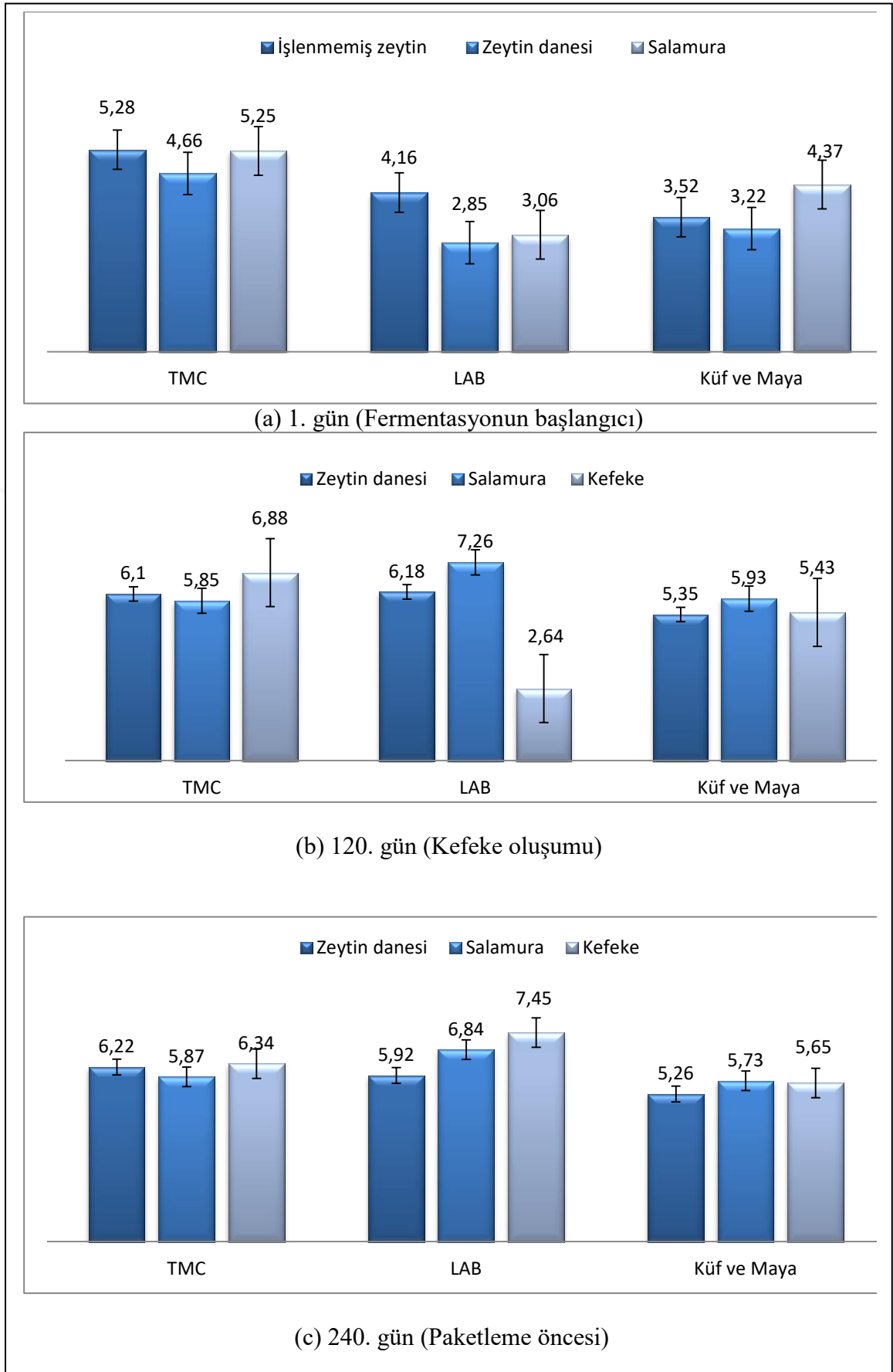
##### **4.5.1. Mikrobiyal Yük**

Doğal fermente sofralık siyah zeytin üretiminde, fermentasyon sürecinden 3 farklı aşamada alınan örneklerde toplam aerobik mezofilik bakteri, toplam laktik asit bakteri ve toplam maya-küf yükleri belirlenmiştir (Şekil 4.6). Şekil 4.6'de görüldüğü üzere, örneklerin mikrobiyal yükleri zamana bağlı olarak 2,5 ile 7,0 log kob/g veya ml arasında değişmiştir. Örneklerin toplam mezofilik bakteri, laktik asit bakteri ve maya-küf sayıları fermentasyonun ilk 4 aylık sürecinde istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir ( $P<0,05$ ). Bunu takiben, sonraki 4 ayda gerçekleşen değişim ise istatistiksel olarak önemli değildir ( $P>0,05$ ). Diğer yandan, fermentasyonun 1. gününde zeytin meyvesindeki mikroorganizmaların bir kısmının salamuraya geçtiği görülmektedir. Çünkü zeytin meyvesinin ilk gün sayımları en yüksek sayımlardır. Fermentasyonun 120. gününde kefeke oluşumu gözlenmeye başlanmıştır. Şekil 4.6'da da görüldüğü gibi, Laktik asit bakteri sayısı hem danede hem de salamurada önemli bir artış göstermiştir. Fakat, kefedeki laktik asit bakteri sayısı sadece 2,64 log kob/g'dır. Kefeye oluşumu başladığında toplam küf-maya sayımı çok daha yüksektir (5,43 log kob/g). Sonraki 4 ayda, diğer değerlerde önemli bir değişim olmazken, kefekenin laktik asit bakteri yükü 5 log artmıştır.

Bakteri florası, zeytin fermentasyonunun nihai kalitesini belirlemede önemli bir role sahiptir (Mourad ve Nour-Eddine, 2006). Elde edilen sonuçlar literatürdeki birçok çalışma ile uyum göstermektedir (Poiana ve ark., 2006; Aponte ve ark., 2010; Alves ve ark., 2012). Örneğin, Aponte ve ark. (2010), toplam canlı sayısının ve toplam maya-küf sayısının 2 log kob/g'dan 6 log kob/g'a kadar arttığını belirtmektedir. Benzer şekilde bu artış, fermentasyonun ortalama 60-70. günlerine kadar devam edip 75. günden sonra çok fazla değişiklik göstermemiştir. Laktik asit bakterileri zeytin florası açısından önemlidir. Sofralık zeytinde laktik asit bakteri izolasyonu ve tanımlanması ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar temel mikrofloranın *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. casei*, *L. brevis* ve *L. lactis*'dan oluştuğunu rapor etmektedir (Mourad ve Nour-Eddine, 2006). Ayrıca Turantaş ve ark. (1999), fermentasyon sürecinde zeytin salamurasındaki laktik asit bakteri sayısının 2 log kob/ml 'den 7 log kob/ml'ye yükseldiğini bildirmiştir. Bu çalışmada elde edilen laktik asit bakteri yüküne benzer sonuçları rapor eden birçok çalışma

bulunmaktadır (Özay ve Bucaklı, 1995; Mourad ve Nour-Eddine, 2006; Hurtado ve ark., 2008; Kumral ve ark., 2009). Laktik asit bakterisi ve mayaların fermentasyon sonunda daha aktif hale geldiği bilinmektedir (Mourad ve Nour-Eddine, 2006). Mourad ve Nour-Eddine (2006) sofralık yeşil zeytinin mikrobiyal florası üzerine yazdığı çalışmada fermentasyonun 60. gününe kadar söz konusu sayımların değişimini gözlemlemiş ve fermentasyon sonunda laktik asit bakterisi miktarının 3 log kob/g, maya miktarının ise 4 log kob/g artış gösterdiğini rapor etmiştir.

Mayalar, sofralık zeytin fermentasyonunda önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar ile sofralık zeytindeki maya florası hem çeşitliliği hem de miktarı bakımından tanımlanmıştır. Florada bulunan temel maya türleri *Candida*, *Pichia*, *Kluyvertomyces*, *Saccharomyces* ve *Rhodotorula* olarak belirtilmektedir (Hurtado ve ark., 2008). Küf-maya sayımlarının ise 2-6 log kob/ml arasında olduğu bildirilmiştir (Poiana ve ark., 2006; Aponte ve ark., 2010). Söz konusu tez çalışmasında, küf-maya sayımı ilk 4 ayda 2 log artış göstermektedir. Fakat 4. aydan sonra hem salamurada hem de zeytin danesinde 0,2 log azalma tespit edilmiştir. Bu azalma, istatistiksel olarak önemli değildir ( $P>0,05$ ). Elde edilen veriler literatür ile uyum göstermektedir (Aponto ve ark., 2010; Gounta ve ark., 2016). Örneğin, Gounta ve ark. (2016) tarafından sofralık zeytin fermentasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada, *L. pentotus* starter kültürü kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonun mikrobiyal kalitesi ve diğer bazı özellikleri belirlenmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan doğal fermentasyonun maya sayımının 3-5 log kob/g aralığında değiştiği rapor edilmiştir. Önceki bir çalışmada da, fermentasyon sürecinde mayalar azalırken küflerde artış olduğunu belirtilmektedir (Alves ve ark., 2012).



Şekil 4.6. Zeytinin fermentasyonu sürecinde mikrobiyal değişimi

#### 4.5.2. Kimyasal Özellikler

Doğal fermente siyah zeytin üretiminin fermentasyon süresi boyunca pH, titrasyon asitliği (TA) ve tuz miktarı gibi fiziko-kimyasal özelliklerindeki değişimler, hem zeytin danesinde hem de salamurada olmak üzere fermentasyonun 1., 120. ve 240. günlerinde analiz edilmiştir. Bulgular, Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Doğal fermente siyah zeytinin fermentasyon süresinde zeytin danesinde ve salamuradaki kimyasal değişimleri

	Özellikler	1. gün	120. gün	240. gün
Zeytin Danesi	pH	5,33±0,05 A	4,72±0,03 B	4,50±0,04 C
	TA (% laktik asit)	0,20±0,01 A	0,39±0,05 B	0,39±0,02 B
	Tuz (%)	1,64±0,11 A	5,41±0,13 B	5,11±0,07 B
Salamura**	pH	5,17±0,01 A	4,70±0,04 B	4,29±0,02 C
	TA (% laktik asit)	0,24±0,02 A	0,50±0,02 B	0,50±0,04 B
	Tuz (%)	8,57±0,14 A	4,94±0,14 B	4,68±0,19 B

\*Sonuçlar "Ortalama ±Standart hata" olarak verilmiştir (n=4).

Farklı harflerle (A,B) gösterilen sıra değerleri birbirinden farklıdır (P<0,05).

\*\* % 10 tuz konsantrasyonu ile hazırlanmıştır

Çizelge 4.5 incelendiğinde pH değerindeki azalmanın tüm fermentasyon sürecinde istatistiksel olarak önemli bulunduğu görülmektedir (P<0,05). Bleve ve ark. (2014) yaptığı bir çalışmada, kullandığı fermente zeytinlerin pH değerinin ilk 5-10 günde hızlı bir şekilde 4,4-4,7'ye kadar düştüğü sonraki dönemlerde ise değişmediğini bildirmiştir. Bu tez çalışmada, analiz dönemleri aralığı daha uzun olduğundan azalmanın ilk dönemleri gözlenememiştir. Panagou ve ark. (2008) ise doğal ve starter kültür kullanılarak yapılan sofralık siyah zeytinlerde fermentasyon sonu pH değerlerinin 3,9-4,0 arasında olduğunu bildirmektedir. Bu değerlerin, bu tez çalışmasında elde edilen değerlere göre biraz daha düşük pH değerlerine sahip oldukları görülmektedir. Benzer şekilde, doğal fermentasyon ve starter kültür kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada (Papadelli ve ark., 2015), starter kültür kullanılan zeytinlerin pH değeri daha düşük olarak belirtilirken, doğal fermente edilen zeytinin pH değeri bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile uyum

göstermektedir. Doğal fermantasyon ile üretilen sofralık siyah zeytinlerin starter kültür ile üretilenlere kıyasla daha yüksek pH değerine sahip olmasının bir diğer örneği de Grounta ve ark. (2016)' nın yaptığı çalışma olarak gösterilebilir. Çalışmada starter kültürlü üretimlerde pH değeri 3,8'e kadar azalırken, doğal fermentasyon sürecinde ise pH 4,7-4,9 arasında değişmektedir (Grounta ve ark., 2016).

Sofralık siyah zeytin fermantasyonunda pH'nın genel değişimi ve azalmanın temel sebebinin mikrofloradaki bakterilerin gerçekleştirmiş olduğu fermantasyon sonucunda oluşan organik asitler olduğu düşünülmektedir (Panagou ve ark., 2008). Bu sebeple, mikrofloranın çeşitliliğine göre pH'da değişim gösterebilir. Fakat, genel olarak literatürdeki çalışmalar ve bu çalışmada pH'nın 4,7 ile 4,0 arasında sonlandığı görülmektedir.

Doğal fermente siyah zeytin üretim sürecinde hem daneye hem de salamuraya potansiyometrik titrasyon asitliği analizi yapılmış ve sonuçlar % laktik asit cinsinden hesaplanmıştır. Bulgular (Çizelge 4.5) incelendiğinde pH değerinin sürekli azalmasına rağmen titrasyon asitliği özellikle ilk 4 ay artış göstermekte sonraki 4 ayda ise önemli bir değişim gözlenmemiştir. Geleneksel olarak ölçülen pH değeri bir gıdanın yalnızca hidrojen iyonu konsantrasyonunun ölçüsüdür. Bu nedenle çözünmeyen asit varlığına ilişkin bir veri elde edilemez. Fakat titrasyon asitliği, aşındırıcı potansiyeline ilişkin daha doğru bilgi verdiği için daha gerçekçi bir ölçüm metodu olarak kullanılabilir (Cairns ve ark., 2002; Grobler ve ark., 1985). Bununla birlikte, gıdaların lezzetine etki eden asitlik kavramını daha iyi tanımlamaktadır (Sadler ve Murphy, 2010). Titrasyon asitliği ile pH arasındaki bu fark sebebi ile fermentasyonun 120 ile 240. günleri arasında pH artmasına rağmen titrasyon asitliğinin değişmeden kaldığı düşünülmektedir.

IOC (Uluslararası Zeytin Konseyi) (IOC, 2004) standartlarına göre; doğal fermente sofralık siyah zeytinde pH en fazla 4,3; titrasyon asitliğide en az %0,30 (0,3 g laktik asit/100 mL salamura) olması gerekmektedir (IOC, 2004; Grounta ve ark.,2016). Elde edilen sonuçlar IOC standartlarına uygun olmamakla birlikte önceki çalışmalar ile karşılaştırıldığında uyumlu olduğu görülmektedir. Fakat, doğal fermentasyon gerçekleştirildiğinden ve mikrofloranın asitlik üzerine etkisinin fazla olmasından dolayı farklı çalışmaların titrasyon asitliği miktarlarında bazı değişiklikler olması doğaldır. Örneğin Bonatsou ve ark. (2017), kalamata çeşidi doğal siyah zeytinlerinin fermantasyonunda, fermantasyon öncesi iyileştirici olarak zeytinlerin ozmotik dehidrasyonu ile birlikte monosodyum glutamat ve sodyum klorür uygulamasının etkisi üzerine yaptığı bir çalışmada, kontrol grubu olarak %7'lik NaCl salamura ile ürettiği sofralık siyah zeytinde fermantasyon bitişinde titrasyon asitliğini %0,60 olarak

belirtilmiştir. Panagou ve ark. 2008, salamurada final titrasyon asitliği oranının % laktik asit cinsinden 0,60 iken, Grounta ve ark. 2008, doğal fermentasyonda final titrasyon asitliğinin % 0,20'nin altında kaldığını belirtmiştir. Bu çalışmada ise titrasyon asitliği %0,50 laktik asit miktarında stabil kalmıştır. Ayrıca, fermentasyon sırasında asitliği, ortam sıcaklığı ve tuz konsantrasyonu gibi faktörler de etkilemektedir (Panagou ve ark., 2008; Saude ve ark., 2017).

Sofralık zeytin üretiminde ham zeytinin içeriğindeki acılık maddelerinin giderilebilmesinde tuzun önemli bir yeri vardır. Tuz miktarı zeytinin tipine, üretim metoduna ve üreticiye göre farklılık göstermektedir. Bu çalışmada, doğal fermente siyah zeytin üretiminde salamura % 10 NaCl şeklinde hazırlanmıştır. Fermentasyon süresinde tuz değişimi incelendiğinde (Çizelge 4.5), tuz geçişinin beklendiği gibi salamuradan daneye doğru yönelimli olduğu görülmektedir. Bu geçiş, fermentasyonun ilk 120 gününde tamamlanmış olup, sonraki 120 günde az miktarda değişim görülsede bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ). Tüketim öncesi danede tuz konsantrasyonu ise % 5,11 olarak belirlenmiştir. Söz konusu bulgular, diğer çalışmalar ile uyumlu olmakla birlikte bu çalışmada tüketim öncesi zeytin tuz oranının diğer çalışmalara kıyasla biraz daha düşük olduğu belirlenmiştir (Özay ve Borcaklı, 1995; Saude ve ark., 2017). Maçanilha Algarvia çeşidi kırma zeytinlerin klorür tuzlarının duyu ve besleyici özellikleri üzerine etkisi ile ilgili yapılan bir araştırmada kontrol grubu olarak kullanılan ve % 8 NaCl ile hazırlanan salamura ile fermente edilen zeytinlerin tuz oranı % 6,94 olarak belirtilmiştir (Saude ve ark., 2017). Benzer şekilde sofralık zeytin üretiminde tuz konsantrasyonlarının ölçüldüğü başka çalışmalar da yapılmıştır (Ünal ve Nergiz, 2003). Salamura başlangıç konsantrasyonuna ve fermentasyon süresine göre değişim göstermekle birlikte çalışmaların söz konusu tez çalışması ve birbirleri ile uyum gösterdikleri görülmektedir. Sofralık zeytinlerde tuz konsantrasyonu, fermentasyonu gerçekleştiren mikroorganizmaları etkilemektedir. Bu nedenle sofralık zeytinlerin fermentasyon süresinde tuzun konsantrasyonu, salamurasının değiştirilip değiştirilmediği gibi faktörler önemlidir. Örneğin, Romero-Gill ve ark. (2013), sıcaklığın ve tuzun sofralık zeytindeki mikroorganizmalar üzerine etkilerini değerlendirme amacıyla yaptığı çalışmada yüksek tuz konsantrasyonda mayaların gelişimini, yüksek sıcaklığın ise laktik asit bakterilerinin gelişimini teşvik ettiğini belirtmiştir. Yapılan çalışmalar fermentasyon süresinde salamura değişiminin son tuz konsantrasyonunu etkilediğini göstermiştir. Salamuranın değiştirildiği ve değiştirilmediği fermentasyon süreçlerinin izlendiği bir çalışmada salamurası değiştirilen sofralık siyah zeytinin tuz konsantrasyonunun kısmen daha yüksek olduğu



bildirilmiştir (Özay ve Borcaklı, 1995). Söz konusu tez çalışmasının salamura suyunda değişim yapılmamıştır. Diğer çalışmalara kıyasla biraz az tuz konsantrasyonuna sahip olmasının bir nedeninin bu olduğu düşünülmektedir.

#### 4.6. Sofralık Siyah Zeytin Üretim Sürecinde Biyoaktif Bileşenlerdeki Değişimler

Zeytin, fenolik bileşenler bakımından zengin ve beslenmemizde fenolik bileşen kaynağı olarak önemli bir gıdadır. Diğer yandan, zeytin fenolikleri antimikrobiyal etki yanında antioksidan özellik de göstermektedir. Fungusların *in vitro* ortamda gelişme ve toksin üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla model ortamların dizayn edilmesinde zeytin fermantasyonu sürecinde biyoaktif bileşenlerdeki değişimlerin izlenmesi önemlidir. Bu nedenle çalışma kapsamında sofralık zeytin üretiminin fermentasyon sürecinde salamura ve zeytin olmak üzere toplam fenol düzeyleri ile birlikte fenolik bileşen profili ve antioksidan kapasitede gerçekleşen değişimler izlenmiştir.

Çizelge 4.6. Toplam fenol ve antioksidan aktivite değerleri

Özellikler		1. gün	120. gün	240. gün
Zeytin Danesi	Toplam fenol (mg GA/g)	866,3±53,9 A	697,5±84,5 A	404,9±76,2 B
	Antioksidan aktivite (CUPRAC, mg TR/kg)	10,84±2,4 A	8,97± 1,25 AB	6,89± 0,4 B
Salamura **	Toplam fenol (mg GA/ml)	56,1±10,2 A	1739,0±84,6 B	2136,0±40,4 C

\*Sonaçlar "Ortalama ±Standart hata" olarak verilmiştir (n=4).

Farklı harflerle (A,B) gösterilen sıra değerleri birbirinden farklıdır (P<0,05).

\*\* % 10 tuz konsantrasyonu ile hazırlanmıştır

Doğal fermente siyah zeytinin fermentasyon süresinde hem zeytin danesi hem de salamura olmak üzere toplam fenolik madde miktarlarına ilişkin bulgular Çizelge 4.6'de gösterilmiştir. Toplam fenol miktarı beklendiği üzere zeytin danesinde yüksek olup, fenolik bileşenlerin fermentasyon sırasında daneden salamuraya difüzyonu gerçekleşmiştir. Danede, 240 günlük fermentasyon sonunda %54'lük bir toplam fenol kaybı söz konusudur. Bunun bir kısmı salamuraya geçerken bir kısmı parçalanarak kaybolmaktadır. Salamurada ise toplam fenol miktarı ilk gün önemli miktarda bulunmazken fermentasyonun ilerleyen dönemlerinde artmaktadır. Zeytin danesinde ilk günden itibaren bir azalma söz konusu olsa da özellikle 120. gün ile 240. gün arasında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0,001). Fakat, salamuradaki toplam fenolik madde artışı, fermentasyonun 240. gününe

kadar önemli düzeyde devam etmiştir ( $P<0,001$ ).

Fenolik madde miktarı ve fenolik bileşenlerin kompozisyonu zeytinin tipi, yetiştiği coğrafi koşullar gibi etkenlerle değişiklik göstermektedir. Bu nedenle konu ile ilgili yapılmış çalışmalarda belirtilen miktarlar ve kompozisyonlar farklılık göstermektedir. Fakat genel olarak, fermentasyon sürecindeki değişim grafiği olarak benzerlik bulunduğu görülmektedir (Kiai ve Hafidi, 2014). Doğal fermentasyon sırasında dört yeşil zeytin çeşidinde kimyasal bileşim değişikliklerinin belirlendiği çalışmada toplam fenol miktarının zeytin danesinde fermentasyon süresinde azaldığı belirtilmiştir. Salamuradaki toplam fenolik madde miktarı ise dört farklı türde (fermentasyonun 71. gününde) 992-2687 mg/L olarak değişiklik göstermektedir (Kiai ve Hafidi, 2014). Benzer bir çalışmayı Tunus sofralık zeytinlerinin farklı çeşitleri ile yapan bir araştırma grubu ise toplam fenolik madde miktarını "48-466 mg/ 100 g kuru zeytin" olarak belirtmiştir (Othman ve ark., 2007).

Fenolik bileşen kompozisyonunun fermentasyon sürecindeki değişimi kromatografik olarak belirlenmiştir. Örneklerin fenolik bileşen profilinde hidroksitirozol, tirozol, rutin, apigenin-7-glikozit, vanilin ve oleuropein tanımlanmış olup fermentasyon sürecinde miktarsal değişimleri incelenmiştir. Bulgular, Çizelge 4.7'de gösterilmektedir. Çizelge 4.7 incelendiğinde değişimin hidroksitirozol, tirozol ve oleuropein fenolikleri açısından önemli olduğu görülmektedir. Bu üç fenolik bileşen, zeytinin temel fenolik kompozisyonunu oluşturmakta ve önemli rol oynamaktadır. Görüldüğü üzere hidroksitirozol fermentasyon sırasında danede azalma göstermiştir. Azalmanın sebebi hidroksitirozolün asit hidroliz reaksiyonu sonucunda parçalanmasıdır (Kiai ve Hafidi, 2014). Zeytin danesi ve salamurada fenolik bileşen profili birbiri ile paralel değişim göstermektedir. Salamuradaki hidroksitirozol artışının sebebi oleuropein ve hidroksitirozol-4- $\beta$ -glikozit bileşiklerinin asit hidrolizi ile hidroksitirozole dönüşmesidir.

Zeytin danesindeki oleuropein zeytine acı tadı veren temel fenolik bileşendir ve duyusal olarak bu acı tadı nedeniyle istenmemektedir. Fermentasyon sürecinde farklı fenolik maddelere hidroliz olur. Çalışma bulgularında da görüldüğü gibi oleuropein yaklaşık %50 azalmıştır (Çizelge 4.7). Oleuropeinin temel hidroliz ürünleri ise oleoside ve 11-metilester'e dönüşmektedir (Bianchi, 2003). Oleuropein, salamurada fermentasyonun ilk 120 gününde önce artış göstermiş daha sonra (120-240. günler arasında) azalmıştır. Diğer çalışmalarla uyum gösteren bu değişimin başlıca sebebinin daneden salamuraya geçiş ve daha sonra salamurada da parçalanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Vanilin, rutin gibi fenoliklerde ise değişimler olsa da istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmektedir ( $P>0,05$ ).

Sofralık zeytinler ve zeytinyağı, sağlığa yararlı olduğu düşünülen birçok fenolik bileşen için iyi bir kaynaktır. Bu sebeple dünya genelinde ve ülkemizde zeytin ve zeytinyağının fenolik bileşen profilinin belirlenmesi ile ilgili yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Bunlardan sonuçları ve değişimleri bu çalışma ile benzerlik gösteren bazıları; Cabrera-Benagil ve ark. (2017), Jerman ve ark. (2010), Kiai ve Hafidi (2014) ve Romero ve ark. (2004) tarafından yapılmış çalışmalardır. Örneğin, Romero ve ark. (2004) tarafından sofralık zeytinin fermentasyon sürecindeki fenolik kompozisyonun değişimi belirlenmiştir. Bu çalışmada olduğu gibi zeytin danesi ve salamura ayrı ayrı analiz edilmiştir. Bu çalışma ile benzer şekilde zeytin danesinde hidroksitirozol artarken oleuropein azalmış, tirozol ise önce azalmış daha sonra artmıştır. Salamurada ise hem oleuropein hem hidroksitirozol önce artmış sonra azalmıştır. Farklı olarak söz konusu tez çalışmasında ise salamurada hidroksitirozolda azalma gözlenmemiştir. Portekiz'e ait sofralık zeytinlerde fenolik bileşikler, antioksidan potansiyeli ve antimikrobiyal aktivite özelliklerinin belirlenmesine yönelik yapılmış bir çalışmada tespit edilen fenolik kompozisyonlar bu tez çalışmasına benzer şekilde yüksek bulunmuştur (Pereira ve ark., 2006). Dünya genelinde yapılan çalışmalara örnek bir araştırma da Cabrera-Benagil ve ark. (2017) tarafından yapılmıştır. Cabrera-Benagil ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada, sofralık zeytin ve zeytin ezemelerindeki temel polifenolik bileşikler hızlı sıvı kromatografisi tekniği ile belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda toplamda 26 polifenolik bileşik tespit edilmiştir. Belirlenen polifenoller incelendiğinde söz konusu tez çalışmasında belirlenen 6 fenolün (hidroksitirozol (3,4-HDPEA), oleuropein, vanilin ve apigenin-7-glukoziti) tamamını içerdiği görülmektedir. %10'luk salamurada 4 ay fermente edilen sofralık zeytinlerde belirlenen polifenol miktarları: hidroksitirozol; 190-300 mg/L, oleuropein; 2-8 mg/L, Apigenin-7-glukozit; 0-5 mg/L olarak belirtilmiştir (Cabrera-Benagil ve ark., 2017). Söz konusu tez çalışmasındaki fermentasyonun 4. aya ait fenolik kompozisyon miktarları (Çizelge 4.7) ile karşılaştırıldığında tez çalışmasına ait zeytin örneklerinin daha yüksek oranda fenolik içerdiği görülmektedir.

Ülkemizde ise Dağdelen ve ark. (2013) tarafından zeytinlerin fenolik kompozisyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Zeytin meyvesinin (*Olea europaea L.*) Ayvalık, Domat ve Gemlik çeşitlerinin farklı olgunlaşma evrelerindeki fenolik profillerinin incelendiği çalışmada, Ağustos-Aralık ayları aralığında mevcut zeytin çeşitlerinin fenolik içeriği belirlenmiştir. Bu çalışmada incelenen 6 fenolik kompozisyonun tamamını içeren mevcut çalışmanın sonuçlarına bakıldığında ham zeytinde fenolik kompozisyonlarının benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu çalışmada zeytin hasadı Kasım-Aralık aylarında yapılmıştır.

Dağdelen ve ark. (2013)'larının çalışmasında ise Kasım-Aralık aylarında zeytinlerin hidroksitirozol ve oleuropein miktarlarının çeşitlere göre değişim göstermekle birlikte artmış olduğu görülmektedir. Fakat bu tez çalışmasında daha fazla olduğu görülmektedir. Tüm önceki çalışmalardan anlaşılacağı üzere sofralık zeytinde fenolik bileşenler miktar ve içerik olarak çok fazla değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlik zeytinin çeşidi, yetiştiği coğrafya, hasat edildiği ay ve sahip olduğu mikro floraya bağlıdır (Periari ve ark., 2006; Dağdelen ve ark. 2013).

Çizelge 4.7. Zeytin danesi ve salamuranın fermentasyon sürecinde fenolik profilindeki değişim

Fenolik Bileşen		1. gün	120. gün	240. gün
Zeytin Danesi (mg/kg)	Hidroksitirozol	1862±278 <sup>A</sup>	2263±304 <sup>AB</sup>	3021±265 <sup>B</sup>
	Tirozol	375.2±41.6 <sup>A</sup>	215.2±35.4 <sup>A</sup>	361.9±26.2 <sup>B</sup>
	Vanilin	47.17±6.68	57.9±16.5	50.1±4.36
	Rutin	45.94±4.72	31.16±7.35	26.38±3.86
	Apigenin 7-glu	194.1±21.4	149.5±42.1	175.0±52.0
	Oleuropein	428.6±65.8 <sup>A</sup>	304.4±50.5 <sup>AB</sup>	127.3±11.6 <sup>B</sup>
Salamura** (mg/L)	Hidroksitirozol	106,24±4,89	210,80±15,2	313,0±147,0
	Tirozol	21,46±1,24 <sup>B</sup>	89,00±24,20 <sup>A</sup>	29,34±2,35 <sup>B</sup>
	Vanilin	<5	<5	6,95±2,53
	Rutin	2,03±0,91	14,52±9,50	22,60±14,50
	Apigenin 7-glu	<1 <sup>B</sup>	15,11±1,79 <sup>A</sup>	4,45±2,28 <sup>B</sup>
	Oleuropein	<25 <sup>B</sup>	261,00±80,20 <sup>A</sup>	56,76±6,77 <sup>B</sup>

\*Soniclar "Ortalama ±Standart hata" olarak verilmiştir (n=4).

Farklı harflerle (A,B) gösterilen sıra değerleri birbirinden farklıdır (P<0,05).

\*\* % 10 tuz konsantrasyonu ile hazırlanmıştır

Yaşlanma süreci sırasında oluşan serbest radikalleri etkisiz hale getirebilen antioksidanlar, kardiyovasküler hastalıklar, bazı nörolojik bozukluklar veya belirli inflamatuvar süreçler gibi bazı kronik hastalıkların başlamasında önleyici rol oynarlar. (Arranz ve ark., 2008). Doğal fermente sofralık zeytin üretim sürecinde, fermentasyonun farklı aşamalarından alınan zeytin örneklerinin antioksidan aktivitesi Apak ve ark. (2004) tarafından geliştirilen CUPRAC metodu ile analiz edilmiştir. Çizelge 4.6'de görüldüğü gibi antioksidan aktivitesinin fermentasyon sürecinde değişimi istatistiksel olarak önemlidir. Antioksidan aktivite fermentasyonla azalma göstermiştir. Bu azalışın, fermentasyon boyunca fenolik bileşenlerin salamuraya geçişi olduğu düşünülmektedir (Owen ve ark., 2003). Sofralık zeytinlerin antioksidan kapasitesi ile ilgili yapılmış önceki çalışmaların

bazılarında antioksidan kapasite değeri, söz konusu çalışmada tespit edilen değerlerden daha az olduğu rapor edilmiştir. Fakat, fenolik analizlerinin sonuçları göz önünde bulundurulduğunda çalışmada kullanılan Edremit eşidi zeytinlerin fenolik madde içeriğinin yüksek olması ve bu sebeple antioksidan kapasitesinin diğer çalışmalardan yüksek bulunmasına neden olduğu düşünülmektedir. Örneğin, lkemizde yapılmış bir çalışmada (Sahan ve ark., 2013) farklı zeytinlerin DPPH yöntemi ile trolox cinsinden antioksidan kapasiteleri hesaplanmış ve en yüksek değer 189,58 mg Trolox/ g taze zeytin olarak belirtilmiştir (Sahan ve ark., 2013).

Literatürdeki alışmalar ve bu çalışmadan elde edilen antioksidan kapasite verileri zeytinin antioksidan alımı için iyi bir gıda olduğunu göstermektedir (Othman ve ark., 2008). Ayrıca yapılmış son alışmalar (Kountouri ve ark., 2007) zeytin fenolik bileşiklerinin biyoyararlanımı üzerine odaklanarak, zeytin tüketiminden sonra fenolik içeriğin plazmada arttığını göstermiştir. Bu sonuç, zeytin fenolik bileşiklerinin, antioksidan etkinliğine uygun, iyi biyoyararlılığa sahip olduklarını göstermektedir (Kountouri ve ark., 2007; Othman ve ark., 2008).

## BÖLÜM 5

### SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Zeytin, hem zeytinyağı hem de sofralık zeytin olarak geçmişten günümüze sofralarımızda önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada, Çanakkale ili merkez ve çevresindeki zeytinlerden elde edilen, doğal yollarla fermente edilen sofralık siyah zeytinin tarladan tüketime kadar fungal florası ve bu floranın toksin üretme potansiyeli belirlenmiştir. Bu amaçla, 2014 yılı hasat dönemi olan Kasım ve Aralık aylarında tarla örnekleme yapılmış, alınan örneklerden doğal fermente siyah zeytin üretimi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonun başlangıç (1.gün), kefeke oluşumu (120. gün) ve tüketim öncesi (240. gün) dönemlerinden örnek alınarak gerekli analizler gerçekleştirilmiştir. Fungal flora ve toksin potansiyellerinin belirlenmesinin yanısıra, laboratuvar-ölçekli üretim yapılan sofralık zeytinin genel mikrobiyolojik kriterlerinin ortaya konulması (Toplam mezofilik canlı sayısı, Laktik asit bakteri sayısı, Toplam küf-maya sayısı), kimyasal özelliklerinin (pH, titrasyon asitliği ve tuz oranı) ve fenolik içeriğinin (toplam fenolik madde miktarı ve fenolik bileşen kompozisyonu) tespit edilmesi için gerekli analizler uygulanmıştır. Ayrıca, fermentasyonun sonlandırıldığı tüketim öncesi dönemde Çanakkale ilinden rastgele seçilen 5 zeytin işletmesinden örnek alınarak fungal izolasyon, tanımlama ve tanımlanan fungal izolatların toksin üretim potansiyelleri açısından inceleme yapılmıştır.

Mikrobiyolojik özelliklerinden toplam mezofilik bakteri, laktik asit bakterisi ve küf-maya sayısı ilk 4 ay istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir ( $P<0,05$ ). Fakat, sonraki 4 ayda değişimi istatistiksel olarak önemli değildir ( $P>0,05$ ). Tüm değerler 2,5 ile 7,0 log arasında bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde fermentasyonun 1. gününde zeytin meyvesinde ki mikroorganizmaların bir kısmının salamuraya geçtiği görülmektedir. Laktik asit bakteri sayısı hem danede hem de salamurada önemli bir artış göstermiştir. Fakat, kefekede ki laktik asit bakteri sayısı sadece 2,64 log kob/g'dür. Kefeke oluşumu başladığında toplam küf-maya sayısı çok daha yüksektir (5,43 log kob/g). Sonraki 4 ayda, diğer değerlerde önemli bir değişim olmazken, kefekenin laktik asit bakteri miktarı 5 log artmıştır. Küf ve maya sayısında fermentasyon süresinde değişimler olsa da önemli bir fark yoktur. Fakat toplam sayıda değişim olmasada içeriğin fermentasyon süresinde değiştiği tahmin edilmektedir. Fermentasyonun ilk dönemlerinde mayalar daha aktif iken ilerleyen dönemlerinde küflerin daha aktif olduğu bilinmektedir.

Çalışmada, üretimi yapılan sofralık zeytinin kimyasal özellikleride belirlenmiştir. pH

fermentasyon süresinde sürekli olarak azalırken titrasyon asitliği özellikle ilk 4 ay artış göstermekte sonraki 4 ayda ise stabil kalmaktadır. Tuz oranında aynı şekilde fermentasyonun ilk 4 ayında dengeye gelerek zeytin danesindeki oranı %8 olacak şekilde sonlanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı zeytin danesinde fermentasyon süresinde azalırken salamurada artmaktadır. Danede ki toplam fenol miktarı fermentasyon süresinde toplam %54'lük bir azalma göstermiştir. Salamurada ise fermentasyonun ilk 4 ayında artarken sonraki 4 ayda bir miktar azaldığı görülmektedir. Bu artışın sebebi daneden salamuraya geçen fenolikler iken sonraki 4 ayda bir miktar azalma göstermesinin suda çeşitli reaksiyonlar sebebi ile parçalanması olduğu düşünülmektedir.

Toplam fenolik madde miktarının yanı sıra fenolik bileşen profilini de belirlemek amacı ile HPLC ile fenolik bileşen profil analizi yapılmıştır. Gerekli standartlar kullanılarak hem danede hemde salamurada oleuropein, hidroksitirozol, tirozol, vanilin, rutin ve apigenin 7 glukozit kompozisyonu belirlenmiştir. Vanilin, rutin ve apigenin 7 glikozit fermentasyon süresinde istatistiksel olarak önemli değişim göstermemektedir ( $P>0,05$ ). Fakat, hidroksitirozol, tirozol ve oleuropein hem salamurada hemde zeytin danesinde fermentasyon süresinde değişime uğramıştır. Hidroksitirozol tüm fermentasyon süresinde en yüksek konsantrasyona sahip fenolik bileşen olarak tespit edilmiştir. Hidroksitirozol artmaktadır, sebebi oleuropein ve hidroksitirozol-4-b-glikozit bileşiklerinin asit hidrolizi ile hidroksitirozole dönüşmesidir. Zeytin için temel fenolik maddelerden olan oleuropein zeytin danesinde fermentasyon süresinde yaklaşık %50 azalmıştır. Salamurada ise önce artış göstermiş daha sonra bir miktar azalmıştır. Salamura da tüm fenoliklerin başlangıçta artmasının sebebi zeytin danesinden suya geçmesidir.

Tarla örneklemeinden tüketime kadar izole edilen funguslar  *$\beta$ -tub* primeri ile amplifiye edilmiş ve sekans edilerek tanımlanmıştır. Çalışmada, toplam 130 izolat elde edilmiş ve tanımlanmıştır. Mevcut gen bölgesinin zeytinlerinde bulunan fungal türler için  *$\beta$ -tub*'in uygun bir tanımlayıcı olduğunu göstermiştir. Yalnızca *Alternaria*'yı tür bazında tanımlamaya yeterli olmamıştır. *Alternaria* tarla örneklemeinde hem yaprak hemde zeytin danesinde baskın fungal flora olarak tanımlanırken sofralık zeytin fermentasyonunda canlılığını sürdüremediği tespit edilmiştir. Sofralık fermente siyah zeytin üretimden yalnızca ilk gününde iki *Alternaria* izolatı elde edilmiş daha sonraki dönemlerinde hiç rastlanmamıştır. Fermentasyonun kefeke oluşumda ve sonraki dönemlerinde baskın fungal flora ise *Penicillium* ve *Aspergillus* olarak belirlenmiştir.

Aynı şekilde işletmelerde yapılan örneklemede de benzer sonuçlar elde edilmiş *Penicillium* ve *Aspergillus* baskın fungal flora olarak bulunmuştur. *Penicillium* fungal

türünde en yaygın *P. crustosum*, *Aspergillus* fungal türünde *A. niger* ve *Monascus* fungal türünde *M. pilosus* tanımlanmıştır. Bunlardan, *A. niger* OTA, *M. pilosus* ise CIT sorumlusu olduğu önceki çalışmalardan bilinmektedir. Yine izole edilen 2 adet *P. expansum*'un CIT üretiminden sorumlu olabildiği bilinmektedir.

Çalışmanın devamında elde edilen tanımlama bilgileri doğrultusunda uygun primerler sentezlenerek izolatlarda OTA ve CIT üretiminden sorumlu gen bölgelerinin amplifikasyonu üzerinden de tanımlamaya gidilmiştir. PZR reaksiyonları, agaroz jelde görüntüleme ve elde edilen PZR ürünlerinin sekanslanması sonucunda *M. pilosus*'dan 5 tanesinde, *A. niger*'den 6 tanesinde *P. expansum*'dan 1 tanesinde sorumlu genin mevcut olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, önceki çalışmalarda OTA ve CIT üretiminden birinci derece sorumlu olarak gösterilmeyen *P. crustosum* ve *P. roquefortii* fungal türlerinde birkaç izolatında toksin üretimi belirlenmiştir. Hem toksin üretme potansiyeli olan izolatların hemde kontrol amaçlı diğer izolatların *in vitro* ortamda toksin üretip üretmedikleri belirlenmesi amacıyla YES agar ortamında inkübe edilen izolatlardan ekstraksiyon yapılarak HPLC analizi ile toksin varlığı belirlenmiştir. Tüm izolatların 21'inde toksin üretiminden sorumlu gen bölgesinin varlığı tespit edilmiştir. HPLC kullanılarak yapılan analizlerde ise izolatların 13'ünün toksin ürettiği bulunmuştur. Zeytin fermentasyonundan izole edilen ve toksin üretim potansiyeline sahip olan türlerin var olduğu tespit edildikten sonra zeytinden toksin izolasyonu yapılmış ve HPLC ile toksin analizi uygulanmıştır. Yapılan toksin analizi sonucunda fermentasyonun hiç bir aşamasında toksin varlığına rastlanmamıştır. Bu durumun, zeytinin yapısı özellikle içerdiği yoğun fenolik bileşen profilinden olduğu düşünülmektedir.

Çalışmanın sonucunda, Çanakkale ili ve çevresinde yetiştirilen ve sofralık zeytin olarak üretilen siyah zeytinin tarladan tüketime kadar *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Monascus* başta olmak üzere farklı fungal türlerin var olduğu tespit edilmiştir. Bu fungusların bazı türlerinin toksin üretim potansiyeli olsa da zeytin fermentasyonunda toksin üretme imkanına sahip olamadıkları anlaşılmaktadır. Halk sağlığı açısından olumlu olan bu durumun sebebinin zeytinin biyoaktif bileşim öğelerinden ileri geldiği düşünülmektedir. Bu tez çalışması ile ortaya konan veriler dikkate alınarak dizayn edilecek *in vitro* koşullarda ve/veya yine bu çalışma ile oluşturulan fungus koleksiyonunda yer alan toksin oluşturduğu tespit edilen türlerin *in vivo* (zeytin fermentasyonu) aşılandığı kontrollü koşullarda toksin üretme potansiyeli üzerine ileri araştırmalar gerçekleştirilebilir. Böylece, izole edilen ve tanımlanan türlerin baskılanması veya olası zararlı etkilerinin önlenmesi açısından mevcut izolatların toksin üretim koşullarının ayrıntılı incelenmesi ve



belirlemesinin bölge ticareti ve insan sağlığı bakımından önemli olan bu ürünün üretim teknolojisinin gelişmesinde faydalı olacağı düşünölmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abarca M.L., Accensi F., Bragulat M.R., Castellá G., Cabañes F.J., 2003. *Aspergillus carbonarius* as the Main Source of Ochratoxin A Contamination in Dried Vine Fruits from the Spanish Market. *Journal of Food Protection*, 66 (3): 504-506.
- Abbas A., Valez H., Dobson A.D.W., 2009. Analysis of the Effect of Nutritional Factors on OTA and OTB Biosynthesis and Polyketide Synthase Gene Expression in *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 135: 22-27.
- Abdel Hameed, A.A., Ayesh A.M., Abdel Razik Mohamed M., Abdel Mawla H.F., 2012. Fungi and Some Mycotoxins Producing Species in the Air of Soybean and Cotton Mills: A Case Study. *Atmospheric Pollution Research*, 3 (1): 126-131.
- Abramson D., Lombaert G., Clear R.M., Sholberg P., Trelka R., Rosin E., 2009. Production of Patulin and Citrinin by *Penicillium expansum* from British Columbia (Canada) apples. *Mycotoxin Research*, 25: 85–88.
- Abriouel H., Benomar N., Lucas R., Galvez A., 2011. Culture-Independent Study of the Diversity of Microbial Populations in Brines During Fermentation of Naturally-Fermented Aloreña Green Table Olives. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 487–496.
- Abou-Zeid A.M., 2012. Review on Citrinin: Synthetic Methods, Molecular Biosynthesis and Effect of Plant Extracts. *British Microbiology Research Journal*, 2(2): 108-122.
- Adlauni C.E., Tozlovanu M., Naman F., Faid M., Pfohl-Leszkowicz A., 2006. Preliminary Data on the Presence of Mycotoxins (Ochratoxin A, Citrinin and Aflatoxin B1) in Black Table Olives “Greek Style” of Moroccan Origin". *Molecular Nutrition and Food Research*, 50: 507–512.
- Ahmed A.M., Rabii N.S., Garbaj A.M., Abolghait S.K., 2014. Antibacterial Effect of Olive (*Olea europaea* L.) Leaves Extract in Raw Peeled Undeveloped Shrimp (*Penaeus semisulcatus*). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2(1): 53-56.
- Aktaş E., 2008. Zeytin Üretimindeki Gelişmeler ve Çanakkale. 25.04.2014, <http://Mpra.Ub.Uni-Muenchen.De/28833/>.

- Al-Ameiri N.S., Karajeh M.R., Qaraleh S.Y., 2015. Molds Associated with Olive Fruits Infested with Olive Fruit Fly (*Bactrocera oleae*) and their Effects on Oil Quality. Jordan Journal of Biological Sciences, 8: 217 - 220.
- Alves M., Gonçalves T., Quintas C., 2012. Microbial Quality and Yeast Population Dynamics in Cracked Green Table Olives fermentations. Food Control, 23: 363-368.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol., 215: 403-410.
- Andreas B., 2017. Molecular Diagnostics to Identify Fungal Plant Pathogens – A Review of Current Methods. Revista Científica Ecuatoriana, 4: 26-35.
- Anonim, 1983. "Gıda Maddeleri Muayene ve Analiz Yöntemleri", T.C. Tarım Orman Köyişleri Bakanlığı, Gıda İşleri Genel Yayın No:65, Ankara, 796 s.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of International. Volue I, II 17 Th Ed., Gaithersburg, USA.
- Apak R., Güçlü K., Ozyurek M., Karademir S.E., 2004. A Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols, Vitamin C and E, Using their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: The CUPRAC Method. J. Agric. Food Chem., 52: 7970–7981.
- Aponte M., Ventrino V., Blaiotta G., Volpe G., Farina V., Avellone G., Lanza C.M., Moschetti G., 2010. Study of Green Sicilian Table Olive Fermentations Through Microbiological, Chemical and Sensory Analyses. Food Microbiol, 27: 162–170.
- Araújo M., Pimentel F.B., Alves R.C., Oliveira M.B.P.P., 2015. Phenolic Compounds from Olive Mill Wastes: Health Effects, Analytical Approach and Application as Food Antioxidants. Trends in Food Science & Technology, 45(2): 200-211.
- Arıcı M., Aluç M., Dağlıoğlu O., Dağlıoğlu F., 2005. Salamura Siyah Zeytinlerde Aflatoksin Kirliliği. Türkiye’de Mikotoksin Çalışmaları. II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Bildiriler Kitabı, İstanbul, 34-39 s.
- Arranz S., Perez-Jimenez J., Saura-Calixto F., 2008. Antioxidant Capacity of Walnut (*Juglans Regia* L.): Contribution of Oil and Defatted Matter. Eur. Food Res. Technol., 227: 425–431.

- Aran N., 2012. Gıda Biyoteknolojisi, Geliştirilmiş 2. Baskı. Nobel Yayınevi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul. 49 s.
- Arroyo-Lopez F.N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernandez A., 2008. Role of Yeasts in Table Olive Production. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2):189-196.
- Astoreca A., Magnoli C., Barberis C., Chiacchiera S.M., Combina M., Dalcero A., 2007. Ochratoxin A Production in Relation to Ecophysiological Factors by *Aspergillus section Nigri* Strains Isolated from Different Substrates in Argentina. *Science of the Total Environment* 388: 16–23.
- Braadbaart F., Marinova E., Sarpaki A., 2016. Charred Olive Stones: Experimental and Archaeological Evidence for Recognizing Olive Processing Residues Used as Fuel. *Vegetation History and Archaeobotany*, 25: 415-430.
- Baffi M.A, Romo-Sanchez S., Ubeda-Iranzo J., Briones-Perez A.I., 2012. Fungi Isolated from Olive Ecosystems and Screening of their Potential Biotechnological Use. *New Biotechnology*, 29: 451-456.
- Ballester A.R., Marcet-Houben M., Levin E., Sela N., Selma-Lazaro C., Carmona L., Wisniewski M., Droby S., Gonzalez-Candelas L., Gabaldon T., 2015. Genome, Transcriptome and Functional Analyses of *Penicillium expansum* Provide New Insights Into Secondary Metabolism and Pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28 (3): 232–248.
- Bailly J.D., Querin A., Le Bars-Bailly, Benard G., Guerre P., 2002. Citrinin Production and Stability in Cheese. *Journal of Food Protection*, 65 (8): 1317–1321.
- Baruta T., Bizikocj M., 2014. Culture-Based and Sequence-Based Sights in to Biosynthesis of Secondary Metabolites by *Aspergillus Terreus* ATCC 20542. *Journal of Biotechnology*, 175: 53–62.
- Baskou D. 2015. Olive and Olive Oil Bioactive Constituents. *Olive oil chemistry and technology*, 2nd edition, AOCS press.

- Bavaro S.L., Susca A., Frivad J.C., Tufariello M., Chytiri A., Perrone G., Mita G., Logrieco A.F., Bleve G., 2017. Isolation, Characterization, and Selection of Molds Associated to Fermented Black Table Olives. *Frontiers in Microbiology*, 8 (1356): 1-14.
- Bautista-Gallego J., Rodríguez-Gómez F., Barrio E., Querol A., Garrido-Fernández A., Arroyo-López F.N., 2011. Exploring the Yeast Biodiversity of Green Table Olive Industrial Fermentations for Technological Applications. *International Journal of Food Microbiology* 147: 89–96.
- Blanc P.J., Loret M.O., Goma G., 1995. Production of Citrinin by Various Species of *Monascus*. *Biotechnology Letters*, 17 (3): 291-294.
- Bleve G., Tufariello M., Durane M., Perbellini E., Ramires F.A., Grieco F., Cappello M.S., De Domenico S., Mita G., Tasioula-Margari M., Logrieco F., 2014. Physico-chemical and Microbiological Characterization of Spontaneous Fermentation of Cellina Di Nardò and Leccino Table Olives. *Frontiers in Microbiology*, 5 (520): 1-18.
- Bianchi G., 2003. Lipids and Phenols in Table Olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 105: 229–242.
- Bogs C., Battilani P., Geisen R., 2006. Development of a Molecular Detection and Differentiation System for Ochratoxin A Producing *Penicillium* Species and its Application to Analyse the Occurrence of *Penicillium Nordicum* in Cured Meats. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 39–47.
- Bonatsou S., Iliopoulos V., Mallouchos A., Gogou E., Oikonomopou V., Krokida M., Taoukis P., Panagou E.Z, 2017. Effect of Osmotic Dehydration of Olives as Pre-Fermentation Treatment and Partial Substitution of Sodium Chloride by Monosodium Glutamate in the Fermentation Profile of Kalamata Natural Black Olives. *Food Microbiology*, 63: 72-83.
- Bourbos V.A., Skoundridakis MT., Metzidakis I., 1999. *Alternaria alternata*: A New Disease of Leafy Cuttings of Olive Shoots. *Acta Horti*, 474: 585–587.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J., 2001. An Easy Screening Method for Fungi Producing Ochratoxin A in Pure Culture. *International Journal of Food Microbiology* 71; 139–144.

- Burçak E.M., 2001. *Penicillium* Cinsi Bazı Küflerin Mikotoksin Oluşturma Özelliklerinin Zeytinde İncelenmesi / The Investigation of Mycotoxin Formation Properties of *Penicillium* Strains in Olive, İstanbul Teknik Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Cabañes F.J., Accensi F., Bragulat M.R., Abarca M.L., Castellá G., Minguéz S., Pons A., 2002. What is the Source of Ochratoxin A in Wine?. *International Journal of Food Microbiology*, 79 (3): 213-215.
- Cabañes F. J., Bragulat M. R., 2008. Ochratoxin A in Profiling and Speciation. In J. Varga, & R. A. Samson (Eds.), *Aspergillus in the genomic era*, 57-67.
- Cabanes F.J., Bragulat M.R., Castellá G., 2013. Characterization of Nonochratoxigenic Strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. *Food Microbiology*, 36: 135-141.
- Cabrera-Banegil M., Schaide T., Manzano R., Delgado-Adamez J., Duran-Meras I., Martín-Vertedor D., 2017. Optimization and Validation of Rapid Liquid Chromatography Method for Determination of the Main Polyphenol Compounds in Table Olives and in Olive Paste. *Food Chemistry*, 233: 164–173.
- Cairns A.M., Watson M., Cleanor S.I., Foye R.H., 2002. The pH and Titratable Acidity of a Range of Diluting Drinks and Their Potential Effect on Dental Erosion. *Journal of Dentistry*, 30 (7–8): 313-317.
- Carbone I., Kohn L.M., 1999. A Method for Designing Primer Set for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 91(3): 553-556.
- Carlucci A., Raimondo M.L., Cibelli F., Phillips A.J.L., Lops F., 2013. *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* Associated with a Decline of Olives in Southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 52 (3): 517–527.
- Castella G., Larsen T.O., Cabanes J., Schmidt H., Alboresi A., Niessen L., Farber P., Geisen R., 2002. Molecular Characterization of Ochratoxin a Producing Strains of the Genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1): 74-83.
- Castella G., Cabanes F.J., 2011. Development of a Real Time PCR System for Detection of Ochratoxin A-producing Strains of the *Aspergillus niger* Aggregate. *Food Control* 22: 1367-1372.

- Castella G., Alborch L., Bragulat M.R., Cabanes F.J., 2015. Real Time Quantitative Expression Study of a Polyketide Synthase Gene Related to Ochratoxin A Biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Food Control*, 53: 147-150.
- Cemeroğlu B., 2010. Gıda Analizlerinde Genel Yöntemler. Cemeroğlu B., Ed. Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:34 , Bizim Grup Basımevi, Ankara, 1-86 s.
- Charoenprasert S., Mitchell A., 2012. Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 60: 7081–7095.
- Cheeseman K., Ropars J., Renault P., Dupont J., Gouzy J., Branca A., Anrahan A.L., Ceppi M., Conseiller E., Debuchy R., Malagnac F., Goarin A., Silar P., Lacoste S., Sallet E., Bensimon A., Giraud T., Brygoo Y., 2014. Multiple Recent Horizontal Transfers of a Large Genomic Region in Cheese Making Fungi. *Nature Communications*, 5 (2876): 1-9.
- Chen F., Hu X., 2005. Study on Red Fermented Rice with High Concentration of Monacolin K and Low Concentration of Citrinin. *International Journal of Food Microbiology*, 103 (3): 331-337.
- Chliyah M., Rhimini Y., Selmaoui K., Touhami A.O., Filali-Maltouf A., El Modafar C., Moukhli A., Oukabli A., Benkirane R., Douira A., 2014. Survey of the Fungal Species Associated to Olive-tree (*olea europaea* l.) in Morocco. *Int. J. Rec. Biotech*, 2: 2322–0392.
- Cicerale S., Lucas L., Keast R., 2010. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2): 458-479.
- Cox R.J., Simpson T.J., 2009. Fungal Type I Polyketide Synthases. *Methods in Enzymology*, 459: 49–78.
- Dağdelen A., Tümen G., Özcan M.M., Dündar E., 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.

- Dağdemir, 2006. Salamura Beyaz Peynirlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Seçilen Bazı İzolatların Kültür Olarak Kullanılabilme Olanakları, Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Türkiye.
- Dao H.P., Mathieu F., Lebrihi A., 2005. Two Primer Pairs to Detect OTA Producers by PCR Method. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 61– 67.
- El Khoury A., Atoui A., 2010. Review: Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, 2: 461-493.
- Eltem R., Öner M., 1995. Mold Flora on Naturel Black Olives in Brine. *Turkish Journal of Biology*, 19: 11-17.
- Eltem R., 1996. Growth and Aflatoxin B, Production on Olives and Olive Paste by Moulds Isolated from ‘Turkish-style’ Natural Black Olives in Brine. *International Journal of Food Microbiology* 32: 217-223.
- Esteban A., Lourdes-Abarca M., Rosa-Bragulat M., Javier-Cabanes F., 2004. Effects of Temperature and Incubation Time on Production of Ochratoxin A by Black *Aspergilli*. *Research in Microbiology*, 155: 861–866.
- Erkmen O., 2011. Gıda Mikrobiyolojisi, 3. Baskı. Ege Üniversitesi Efil Yayınevi, İzmir. 22 s.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. “Crops”. 14 Temmuz 2018. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2004. FAO (Food and Agriculture Organization) Worldwide Regulations for Mycotoxins in Foods and Feeds in 2003. FAO Food and Nutrition Paper, 81p.
- Feng W., Zheng X., 2006. Control of *Alternaria alternata* by Cassia Oil in Combination with Potassium Chloride or Sodium Chloride. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1317–1322.
- Ferracane R., Tafuri A., Logieco A., Galvano F., Balzano D., Ritieni A., 2007. Simultaneous Determination of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A and Their Natural Occurrence in Mediterranean Virgin Olive Oil. *Food Addit. Contam.*, 24 (2): 173-180.



- Filttenborg O., Frisvad T.C., Samson R.A., 2000. Specific Association of Fungi to Foods and Influence of Physical Environmental Factors. In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filttenborg, O. (Eds.), Introduction to Food- and Airborne Fungi (6th ed.), Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 306–320 p.
- Franzetti L., Scarpellini M., Vecchio A., Planeta D., 2011. Microbiological and Safety Evaluation of Green Table Olives Marketed in Italy. Annual of Microbiology, 61(4): 843-651.
- Gallo A., Epifani F., Bonsegna S., Pascale M., Santino A., Perrone G., 2010. Analysis of Genes Early Expressed During *Aspergillus flavus* Colonisation of Hazelnut. International Journal of Food Microbiology 137 (2010) 111–115.
- Garrido-Fernandez A., Fernandez-Diez M.J., Adams M.R., 1997. Table Olive, Production and Processing (1th ed.), Chapman and Hall, Londra, 496 p.
- Geisen R., 2004. Molecular Monitoring of Environmental Conditions Influencing the Induction of Ochratoxin a Biosynthesis Genes in *Penicillium Nordicum*. Mol. Nutr. Food Res., 48: 532–540.
- Geisen R., Schmidt-Heydt M., Karolewicz A., 2006. A Gene Cluster of the Ochratoxin A Biosynthetic Genes in *Penicillium*. Mycotoxin Research, 22 (2): 134-141.
- Ghitalou S., Koutras K., Kanellou E., Markaki, 2006. Study of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A Production by Natural Microflora and *Aspergillus parasiticus* in Black and Green Olives of Greek Origin. Food Microbiology, 23: 612-621.
- Gil-Serna J., Patiño B., Cortes L., Gonzalez-Jaen M.T., Vazquez C., 2015. *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as Potential Risk of OTA Contamination in Food Products in Warm Climates. Food Microbiology, 46: 168-175.
- Girgin G., Başaran N., Şahin G., 2001. Derleme; Dünyada ve Türkiye’de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler. Türk Hij Den Biyol Derg, 58(3): 97-118.
- Glass N.L., Donaldson G.C., 1995. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. Appl. Environ. Microb. Apr., 1323–1330.

- Grobler S.R., Jenkins G.N., Kotze D., 1985. The Effects of the Composition and Method of Drinking of Soft Drinks on Plaque. Ph. British Dental Journal, 158: 293-296.
- Grounta A., Doulgeraki A.I., Nychas G.J.E., Panagou E.Z., 2016. Biofilm Formation on Conservolea Natural Black Olives During Single and Combined Inoculation with a Functional *Lactobacillus pentosus* Starter Culture. Food Microbiology, 56: 35-44.
- Gonvances J.S., Ferracin L.M., Vieira M.L.C., Iamanaka B.T., Taniwaki M.H., Pelegrinelli Fungaro M.H., 2012. Molecular Analysis of Aspergillus Section Flavi Isolated from Brazil Nuts. World J. Microbiol. Biotechnol., 28: 1817–1825.
- Göçmen D., Korukluoğlu M., Uylaşer V., Gürbüz O., Yıldırım A., Şahin İ., 2000. Salamura Zeytinlerde Bozulma Etmeni Küfler. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu, 467-472 s., Bursa.
- Hall T.A., 1999. Bioedit: A User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95–98.
- Haliki E., 2016. Filogeni ve Filogenetik Ağaçlar. 21.11.2017.  
<http://rasyonalist.org/yazi/filogeni-ve-filogenetik-agaclar>.
- Hayat A., Paniel N., Rhouati A., Marty J.L., Barthelmebs L., 2012. Review: Recent Advances in Ochratoxin A-Producing Fungi Detection Based on PCR Methods and Ochratoxin A Analysis in Food Matrices. Food Control., 26: 401-415.
- Heperkan D., Meric B.E., Sismanoglu G., Dalkılıç G., Güler F.K., 2006. Mycobiota, Mycotoxigenic Fungi and Citrinin Production in Black Olives. Adv. Exp. Med. Biol., 571: 203-210.
- Heperkan D., Sismanoglu-Dazkır G., Zorlutuna-Kansu D., Karbancıoğlu-Güler F., 2009. Influence of Temperature on Citrinin Accumulation by *Penicillium citrinum* and *Penicillium verrucosum* in Black Table Olives. Toxin Reviews, 8(2–3): 180–186.
- Heperkan D., 2013. Microbiota of Table Olive Fermentations and Criteria of Selection for their Use as Starters. Frontiers in Microbiology, 4: 1-11.
- Hong S.Y., Oh J.H., Lee I., 2011. Simultaneous Enrichment of Deglycosylated Ginsenosides and Monacolin K in Red Ginseng by Fermentation with *Monascus pilosus*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 75: 1490-1495.

- Huff W.E., Hamilton P.B., 1979. Mycotoxins - Their Biosynthesis in Fungi: Ochratoxins - Metabolites of Combined Pathways. *Journal of Food Protection*, 42 (10): 815-820.
- Hurtado A., Reguant C., Esteve-Zarzoso B., Bordoos A., Rozes N., 2008. Microbial Population Dynamics during the Processing of Arbequina Table Olives. *Food Research International*, 41: 738–744.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2018. List of Classifications, vol 1-222. 12 Ekim 2018, <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications-volumes/>.
- Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E., Karam N.E., 2009. Naturally Fermented Jijelian Black Olives: Microbiological Characteristics and Isolation of Lactic Acid Bacteria. *Grasas y Aceites*, 60 (5):514-518 .
- International Olive Council (IOC), 2004. Trade Standart Applying to table olives. DOI/OT/Nc no 1, Madrid, Spain.
- Jerman T., Trebse P., Mozetic-Vodopivec B., 2010. Ultrasound-assisted Solid Liquid Extraction (USLE) of Olive Fruit (*Olea Europaea*) Phenolic Compounds. *Food Chemistry*, 123: 175–182.
- Jiang G., Yang B., Qin Q., Wang G., Zuo X., 2011. Isolation and Identification of an Endophytic Fungus Associated with *Juglans regia L.* and ITS Bioactivity. *Agricultural Science and Technology*, 12(11): 1637-1639.
- Kabak B., Var I., 2006. Ülkemiz Açısından Sorun Olan Mikotoksinler ve Riskli Gıda Maddeleri, Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- Kara G.N., Özbaş Z.Y., 2013. Sofralık Zeytin Üretiminde Doğal Maya Florasının Önemi. *Gıda*, 38(6): 375-382.
- Karaca H., Yemiş O., 2008. Mikotoksin Kontaminasyonu: Zeytin ve Ürünlerinde Toksin Riski, I.Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi 17-18 Mayıs 2008, Balıkesir.
- Karbancıoğlu-Güler F., Heperkan D., 2008. Natural Occurrence of Ochratoxin A in Dried Figs. *Analytica Chimica. Acta.*, 617 (1–2): 32-36.
- Kiai H., Hafidi A., 2014. Chemical Composition Changes in Four Green Olive Cultivars During Spontaneous Fermentation. *Food Science and Technology*, 57: 663-670.

- Kim D.M., Chung S.H., Chun H.S., 2011. Multiplex PCR Assay for the Detection of Aflatoxigenic and Non-Aflatoxigenic Fungi in Meju, a Korean Fermented Soybean Food Starter. *Food Microbiology*, 28: 1402-1408.
- Krogh P., 1992. Role of Ochratoxin in Disease Causation. *Food Chem Toxicol*, 30(3): 213–224.
- Kokkonen M., Jestoi M., Rizzo A., 2005. The Effect of Substrate on Mycotoxin Production of Selected *Penicillium* Strains. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 207–214.
- Korukluoğlu M., Gürbüz O., Uylaşer V., Yildirim A., Sahin I., 2000. Gemlik tipi Zeytinlerde Mikotoksin Kirliliginin Arastirilmesi, Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu. Uludağ Üniversitesi 6–9 Haziran, Bursa. Bildiri Kitabı, pp. 218–218.
- Kountouri A.M., Kaliona A.C., Andrikopoulos N.K., 2007. Bioavailability of the Phenolic Compounds of the Fruits (Drupes) *Olea Europaea* (Olives): Impact on Plasma Antioxidant Status in Humans. *Phytomedicine*, 14: 659-67.
- Kumral A., Başoğlu F., Şahin I., 2009. Effect of the Use of Different Lactic Starters on the Microbiological and Physicochemical Characteristics of Naturally Black Table Olives of Gemlik Cultivar. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33: 651–664.
- Larsen T.O., Svendsen A., Smedsgaard J., 2001. Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8): 3630–3635.
- Lee C.L., Wang J.J., Pan T.M., 2006. Synchronous Analysis Method for Detection of Citrinin and the Lactone and Acid Forms of Monacolin K in Red Mold Rice. *Journal of AOAC International* 89(3): 669-677.
- Leontopoulos D., Siafaka A., Markaki P., 2003. Black Olives as Substrate for *Aspergillus parasiticus* Growth and AflatoxinB 1 Production. *Food Microbiology* 20: 119–126.
- Li Y., Zhou C., Yang M.H., Ou-Yang Z., 2012. Natural Occurrence of Citrinin in Widely Consumed Traditional Chinese Food Red Yeast Rice, Medicinal Plants and their Related Products. *Food Chemistry*, 132(2): 1040-1045.

- Liu Q., Xie N., He Y., Wang L., Shao Y., Zhao H., Chen F., 2014. A Gene Involved in Pigment Biosynthesis in *Monascus Ruber M7*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98: 285-296.
- Lumi Abe, C. A., Bertechini Faria, C., Fernandes de Castro, F., et al. 2015. Fungi Isolated from Maize (*Zea mays L.*) Grains and Production of Associated Enzyme Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7): 15328–15346.
- Luo H., 2011. Extraction of Antioxidant Compounds from Olive (*olea europea*) Leaf. Massey University, Albany, New Zealand.
- Magnoli C., Violante M., Combina M., Palacio G., Dalcero A., 2003. Mycoflora and Ochratoxin-Producing Strains of *Aspergillus section Nigri* in Wine Grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37:179-184.
- Manonmani H.K., Anand S., Chandrashekar A., Rati E.R., 2005. Detection of Aflatoxigenic Fungi in Selected Food Commodities by PCR. *Process Biochemistry*, 40: 2859–2864.
- Marshall R.T., 1992. Standard Methods For The Examination of Dairy Products (16th ed.). Apha., Washington, Dc.. 286-348 p.
- Marsilio V.C., Campestre B., Lanza, DeAngelis M., 2001. Sugar and Polyol Compositions of Some European Olive Fruit Varieties (*Olea Europaea L.*) Suitable or Table Olive Purposes. *Food Chemistry*, 72: 485–490.
- Maurer J.J. 2011. Rapid Detection and Limitations of Molecular Techniques. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2: 259–279.
- McDonald S., Prenzler P.D., Antolovich M., Robards K., 2001. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Olive Extracts. *Food Chemistry*, 73 (1): 73-84.
- Medina E., Brenes M., Garcia-Garcia P., Romero C., Castro A., 2018. Microbial Ecology along the Processing of Spanish Olives Darkened by Oxidation. *Food Control*, (86): 35-41.
- Moriatti A., Susca G., Mulé A.F., Logrieco R.H., Proctor R.H., 2013. Molecular Biodiversity of Mycotoxigenic Fungi That Threaten Food Safety. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 57–66.

- Moss M.O., 1996. Mode of Formation of Ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, 13: 5–9.
- Moss M.O., 1998. Recent Studies of Mycotoxins. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, 27: 62–76.
- Mourad K., Nour-Eddine K., 2006. Microbiological Study of Naturally Fermented Algerian Green Olives: Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and Yeasts Along with the Effects of Brine Solutions Obtained at the End of Olive Fermentation on *Lactobacillus plantarum* growth. *Grasas Y Aceites*, 57: 292-300.
- Munoz K., Vega M., Rios G., Geisen R., Degen G.H., 2011. Mycotoxin Production by Different Ochratoxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* Species on Coffee and WheatBased Media, *Mycotox. Res.*, 27: 239–247.
- Niessen L., 2007. PCR-based diagnosis and Quantification of Mycotoxin Producing Fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 38–46.
- Nizamlioğlu N.M., Çon A.H., 2010. Gıda ve Yemlerde Önemli Mikotoksinler: CIT, Sitreoviridin ve Sterigmatosistin. *Akademik Gıda*, 8(5): 29-36.
- O'Callaghan J.O., Caddick M.X., Dobson D.W., 2003. A polyketide Synthase Gene Required for Ochratoxin A Biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, 149: 3485–3491.
- O'Callaghan J.O., Coghlan A., Abbas A., Garcia-Estrada C., Martin J.F., Dobson A.D.W., 2013. Functional Characterization of the Polyketide Synthase Gene Required for Ochratoxin A Biosynthesis in *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*, 161: 172–181.
- Oliveria I., Pereira A., Lino-Neto T., Bento A., Baptista P., 2012. Fungal Diversity Associated to the Olive Moth, *Prays Oleae* Bernard: A survey for Potential. *Entomopathogenic Fungi. Microb. Ecol.*, 63: 964-974.
- Oral J., Heperkan D., 1999. Penicilic Acid and Citrinin Production in Olives. In *Food Microbiology and Food Safety into the Next Millenium. Proceedings of the 17th International ICFMH Conference*, ACJ Tuijtelaars, RA Samson, FM Rombouts, S Notermans (eds), Veldhoven, The Netherlands. 138-140 p.

- Oruç H., 2006. Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri. Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med. 24 (1-2-3-4): 105-110.
- Ostry V., 2008. *Alternaria* mycotoxins: An Overview of Chemical Characterization, Producers, Toxicity, Analysis and Occurrence in Foodstuffs. World Mycotoxin Journal, 1: 175-188.
- Ostry V., Malir F., Ruprich J., 2013. Review: Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. Toxins, 5: 1574-1586.
- Othman N.B., Roblain D., Thonart P., Hamdi M., 2007. Tunisian Table Olive Phenolic Compounds and Their Antioxidant Capacity. Journal of Food Science, 73 (4): 235-240.
- Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Spiegelhalder B., Bartsh H., 2000. The Antioxidant/Anticancer Potential of Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil. European Journal of Cancer, 36: 1235-1247.
- Owen R.W., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B., Barts H., 2003. Isolation, Structure Elucidation, and Antioxidant Potential of the Major Phenolic and Flavonoid Compounds in Brined Olive Drupes. Food Chem. Toxicol., 41: 703-717.
- Öksüztepe G., Erkan S., 2016. Mikotoksinler ve Halk Sağlığı Açısından Önemi. Harran Üniv. Vet. Fak. Derg., 5(2): 190-195.
- Özay G., Borcaklı M., 1995. Effect of Brine Replacement and Salt Concentration on the Fermentation of Naturally Black Olives. Food Research International, 28: 553-559.
- Özkaya F.D., Cömert M., 2008. Gıda Zehirlenmelerinde Etken Faktörler. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 65(3): 149-158.
- Özkaya M. T., Tunalıoğlu R., Eken Ş., Ulaş M., Tan M., Danacı A., İnan N., Tibet İ., 2010. Türkiye Zeytinciliğinin Sorunları ve Çözüm Önerileri. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, 11-15 Ocak 2010.
- Özkılınç H., Sevinç U., 2018. Molecular Phylogenetic Species in *Alternaria* Pathogens Infecting Pistachio and Wild Relatives, Biotech. 8(250).
- Öztürk F., Yalçın M., Dıraman H., 2009. Türkiye Zeytinyağı Ekonomisine Genel Bir Bakış. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 4(2): 35-51.

- Panagou E.Z., Schillinger U., Franz C.M.A.P., Nychas G.J.E., 2008. Microbiological and Biochemical Profile of cv. Conservolea Naturally Black Olives During Controlled Fermentation with Selected Strains of Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology*, 25: 348–358.
- Papachristou A., Markaki P., 2004. Determination of Ochratoxin A in Virgin Olive Oils of Greek Origin by Immunoaffinity Column Clean-Up and High Performance Liquid Chromatography. *Food Addit. Contam.*, 21(1): 85-92.
- Papadelli M., Zoumpopoulou G., Georgalaki M., Anastasiou R., Manopoulou E., Lytra I., Papadimitriou K., Tsakalidou E., 2015. Evaluation of two Lactic Acid Bacteria Starter Cultures for the Fermentation of Natural Black Table Olives (*Olea europaea* L cv Kalamon). *Polish Journal of Microbiology*, 64 (3): 265–271.
- Pardo E., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J., 2005. Impact of Relative Humidity and Temperature on Visible Fungal Growth and OTA Production of Ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* Isolates on Grapes. *Food Microbiology*, 22 (5): 383-389.
- Pastor F.J., Guerro J., 2008. *Alternaria* Infections: Laboratory Diagnosis and Relevant Clinical Features. *Journal Compilation 2008 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14: 734-746.
- Patin B., Lez-Salgado A.G., Lez-Jaen M.T.G., VaZquez C., 2005. PCR Detection Assays for the Ochratoxin-Producing *Aspergillus Carbonarius* and *Aspergillus Ochraceus* Species. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 207– 214.
- Pavón M.A., González I., Martín R., García T., 2012a. A Real-Time Reverse Transcriptase PCR Technique for Detection and Quantification of Viable *Alternaria spp.* in Foodstuffs. *Food Control.*, 28: 286-294.
- Pavón M.A., Luna A., Cruz S., González I., Martín R., García T., 2012b. PCR-Based Assay for the Detection of *Alternaria* Species and Correlation with HPLC Determination of Altenuene, Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether Production in Tomato Products. *Food Control.*, 25: 45-52.



- Pereira J.A., Pereira A.P.G., Ferreira I.C.F.R., Valentao P., Andrade P.B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., 2006. Table Olives from Portugal: Phenolic Compounds, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 8425-8431.
- Pereira A.P., Ferreira I.C.F.R., Marcelino F., Valentao P., Andrade P.B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J.A., 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*olea europaea* l. cv. *cobrançosa*) Leaves. *Molecules*, 12: 1153-1162.
- Perrone G., Mule G., Susca A., Battilani P., Pietri A., Logrieco A., 2006. Ochratoxin A Production and Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Aspergillus carconarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* Strains Isolated from Grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1): 680-685.
- Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R.A., 2007. Review: Ochratoxin A: An Overview on Toxicity and Carcinogenicity in Animals and Humans. *Mol. Nutr. Food. Res.*, (51): 61-99.
- Piccolo S.L., Mondello V., Giambra S., Conigliaro G., Torta L., Burrano S., 2014. *Arthrinium phaeospermum*, *Phoma cladoniicola* and *Ulocladium consortiale*, New Olive Pathogens in Italy. *J Phytopathol*, 162: 258–263.
- Pisareva E., Savov V., Kujumdzieva A., 2005. Pigments and Citrinin Biosynthesis by Fungi Belonging to Genus *Monascus*. *Z. Naturforsch.*, 60: 116-120.
- Poiana M., Romeo F.V., 2006. Changes in Chemical and Microbiological Parameters of Some Varieties of Sicily Olives During Natural Fermentation. *Grasas Y Aceites*, 57: 402-408.
- Porru C., Rodríguez-Gómez F., Benítez-Cabello A., Jiménez-Díaz R., Zara G., Budroni M., Mannazzu I., Noé Arroyo-López F., 2018. Genotyping, Identification and Multifunctional Features of Yeasts Associated to Bosana Naturally Black Table Olive Fermentations. *Food Microbiology*, 69: 33-42.
- Postollec F., Falentin H., Pavan S., Combrisson J., Sohier D., 2011. Recent Advances in Quantitative PCR (QPCR) Applications in Food Microbiology. *Food Microbiology*, 1-14.

- Ramana M.V., Balakrishna K., Murali H.S., Batra H.V., 2011. Multiplex PCR-based Strategy to Detect Contamination with Mycotoxigenic *Fusarium* Species in Rice and Finger Millet Collected from Southern India. *J. Sci. Food Agric.*, 91: 1666-1673.
- Rapoport H.F., Fabri A., Sebastiani L., 2016. The Olive Tree Genome: Olive biology (Ch 2). Rugini, E., Baldoni, L., Muleo, R., Sebastiani, L. (Eds.), Springer, 193p., ISBN:978-3-319-48886-8.
- Rodríguez A., Ángel Medina A., Juan J., Nareshmagana C.B., 2014. The Influence of Salt (NaCl) on Ochratoxin A Biosynthetic Genes, Growth and Ochratoxin A Production by Three Strains of *Penicillium nordicum* on a Dry-Cured Ham-Based Medium. *International Journal of Food Microbiology* 178: 113–119.
- Romero C., Brenes M., Garciaa P., Garciaa A., Garrido A., 2004. Polyphenol Changes during Fermentation of Naturally Black Olives. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1973-1979.
- Romero-Gill V., Bautista-Gallego J., Rodriguez-Gomez F., Garcia-Garcia P., Jimenez-Diaz R., Garrido-Fernandez A., Arroyo-Lopez F.N., 2013. Evaluating the Individual Effects of Temperature and Salt on Table Olive Related Microorganisms. *Food Microbiology*, 33: 178-184.
- Runtberget T., Skaar I., Flaayen A., 2004. The Presence of *Penicillium* and *Penicillium* Mycotoxins in Food Wastes. *International Journal of Food Microbiology*, 90 (2): 181-188.
- Russell R., Peterson M., 2006. Identification and Quantification of Mycotoxigenic Fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41:1467–1474.
- Roussos S., Zaouia N., Salih G., Tantaoui-Elaraki A., Lamrani K., Cheheb M., Hassouni H., Verhe F., Perraud-Gaime I., Augur C., Ismaili-Alaoui, 2006. Characterization of Filamentous Fungi Isolated from Moroccan Olive and Olive Cake: Toxinogenic Potential of *Aspergillus* Strains. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(6): 500–506.
- Sabuncuoğlu S.A., Baydar T., Giray B., 2008. Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28(1):63-92.

- Sadler G.D., Murphy P.A., 2010. pH and Titratable Acidity. Food Analysis, Springer, Boston, 219-238 p.
- Sahan Y., Cansev A., Gülen H., 2013. Effect of Processing Techniques on Antioxidative Enzyme Activities, Antioxidant Capacity, Phenolic Compounds and Fatty Acids of Table Olives. Food Sci. Biotechnol., 22(3): 613-620.
- Saldamlı İ., Gıda Kimyası, 2001, 3. Baskı. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara. 520 s.
- Saude C., Barros T, Mateus T., Quintas C., Pires-Cabral P., 2017. Effect of Chloride Salts on the Sensory and Nutritional Properties of Cracked Table Olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. Food Bioscience, 19: 73–79.
- Saygın Gümüşkesen A., Yemişçioğlu F., 2010. Bitkisel Sıvı ve Katı Yağ Üretim Teknolojisi. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü. İzmir, ISBN 975-94208-0-5.
- Schmidt-Heydt M., Baxter E., Geisen R., Magan N., 2007. Physiological Relationship between Food Preservatives, Environmental Factors, Ochratoxin and *otapksPV* Gene Expression by *Penicillium verrucosum*. International Journal of Food Microbiology, 119: 277-283.
- Schmidt-Heydt M., Rüfer C., Raupp F., Bruchmann A., Perrone G., Geisen R., 2011. Influence of Light on Food Relevant Fungi with Emphasis on Ochratoxin Producing Species. International Journal of Food Microbiology, 145 (1): 229-237.
- Schmidt-Heydt M., Graf E., Stoll D., Geisen R., 2012. The Biosynthesis of Ochratoxin A by *Penicillium* as one Mechanism for Adaptation to NaCl Rich Foods. Food Microbiology, 29: 233-241.
- Schumann J., Herweck C., 2006. Advances in Cloning, Functional Analysis and Heterologous Expression of Fungal Polyketide Synthase Genes. Journal of Biotechnology 124: 690–703.

- Scott P.M., Walbeek W., Kennedy B., Anyeti D., 1972. Mycotoxins (Ochratoxin A, Citrinin and Sterigmatocystin) and Toxigenic Fungi in Grains and Other Agricultural Products. *Mycotoxins and Toxigenic Fungi, J. ang. Food. Chem.*, 20(6): 1103-1109.
- Shimizu T., Kinoshita H., Ishihara S., Sakai K., Nagai S., Nihira T., 2005. Polyketide Synthase Gene Responsible for Citrinin Biosynthesis in *Monascus Purpureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 3453–3457.
- Singleton V.L., Rossi J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-153.
- Sivakumar G., Bati C.B., Uccella N., 2005. HPLC-MS Screening of the Antioxidant Profile of Italian Olive Cultivars. *Chem. Nat. Compd.*, 41, 588–591.
- Spadaro D., Patharajan S., Kartikeyan M., Lore A., Garibaldi A., Gullino M.L., 2011. Specific PCR Primers for the Detection of Isolates of *Aspergillus carbonarius* Producing Ochratoxin A on Grapevine. *Ann. Microbiol.*, 61: 267–272.
- Staunton J., Weissman K.J., 2001. Polyketide Biosynthesis: A Millennium Review. *Natural Product Reports*.
- Su Y.C., Wang J.J., Lin T.T., Pan T.M., 2003. Production of the Secondary Metabolites C-Aminobutyric Acid and Monacolin K by *Monascus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 41–46.
- Susamcı E., Ötleş S., Irmak Ş., 2011. Sofralık Zeytinin Besin Öğeleri, Duyusal Karakterizasyonu ve İşleme Yöntemleri Arasındaki Etkileşimler. *Zeytin Bilimi*, 2 (2): 65-74.
- Şahin I., Başoğlu F., Korukluoğlu M., Göçmen D., 1999. Salamura Siyah Zeytinlerde Rastlanan Küfler ve Mikotoksin Riskleri. *Kükem Dergisi*, 22 (2): 1-8.
- Şahin I., Korukoglu M., 2000. Küf-Gıda-İnsan. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı, Yayın No: 155, Bursa.
- Şahin O.I, Aka A., Akpınar-Bayizit A., Baltaş-Minas E., 2010. Sofralık Zeytin Üretim Tesislerinde Gıda Güvenliği Yönetim Sisteminin Uygulanması. *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(1), 11-24.

- Talhaoui N., Taamalli A., Gomez-Caravaca A.M., Fernandez-Gutierrez A., Segura-Carretero A., 2015. Phenolic Compounds in Olive Leaves: Analytical Determination, Biotic and Abiotic Influence and Health Benefits. *Food Research International*, 77: 92–108.
- Tekeoğlu M., Özkılınç H., Tunalı B., Küsmenoğlu İ., Chen W., 2017. Molecular Identification of *Fusarium Spp.* Causing Wilt Of Chickpea and the First Report of *Fusarium Redolens* in Turkey. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 30 (1): 27-33.
- Tetik H.D., 2005. Sofralık Zeytin İşleme Teknikleri. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 53, İzmir. 136s.
- Timonin M.I., Rouatt J.W., 1944. Production of Citrinin by *Aspergillus sp.* of the Candidus Group. *Canadian Journal of Public Health / Revue Canadienne de Santé Publique*, 35(2): 80-88.
- Tofalo R., Perpetuini G., Schirone M., Suzzi G., Corsetti A., 2013. Yeast Biota Associated to Naturally Fermented Table Olives from Different Italian Cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 161 (3): 203-208.
- Tokuşoğlu Ö., Alpasb H., Bozoğlu F., 2010. High Hydrostatic Pressure Effects on Mold Flora, Citrinin Mycotoxin, Hydroxytyrosol, Oleuropein Phenolics and Antioxidant Activity of Black Table Olives Innovative. *Food Science & Emerging Technologies* 11 (2):250–258.
- Tokuşoğlu Ö., 2016. Özel Meyve Zeytin Kimyası, Kalite ve Teknolojisi, Genişletilmiş 2. Baskı. Sıdaş Yayınları, İzmir. 113-121 s.
- Topal R.Ş., 2003. Türkiye'nin Tarımsal Ürün ve Bölgelerine göre Dominant Mikroflora Dağılımları ve Mikotoksin Profilleri. *Orlab On-line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(12): 7-21.
- Trung T.S., Bailly J.D., Querin A., Le Bars P., Guerre P., 2001. Fungal Contamination of Rice from South Vietnam, Mycotoxinogenesis of Selected Strain and Residues in Rice. *Revue de Medecine Veterinaire*, 152 (7): 555-560.
- Tsukahara M., Shinzato N., Tamaki Y., Namihira T., Matsui T., 2009. Red Yeast Rice Fermentation by Selected *Monascus sp.* with Deep-Red Color, Lovastatin Production But No Citrinin, and Effect of Temperature-Shift Cultivation on Lovastatin Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158 (2): 476-482.

- TUIK, 2013. <http://www.tuik.gov.tr/ilGostergeleri/iller/CANAKKALE.pdf>. 28.06.2017.
- TUIK, 2016. [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001). 28.06.2017.
- Tunail N., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2. baskı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, Sim Matbaası, Ankara. 522 s.
- Turantaş F., Göksungur Y., Dinçer A.H., Ünlütürk A., Güvenç U., Zorlu N., 1999. Effect of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate on Microbial Population and Fermentation of Black Olives. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1197-1202.
- Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 2016. 09 Ocak 2017, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8-1.pdf>.
- Ulusal Zeytin ve Zeytinyağı Konseyi (UZZK). “2017-2018 Üretim Sezonu Sofralik Zeytin ve Zeytinyağı Rekoltesi Ulusal Resmi Tespit Heyeti Raporu”. 12 Haziran 2018, [http://uzzk.org/Belgeler/TURKIYE\\_REKOLTE\\_RAPOR\\_2017\\_2018.pdf](http://uzzk.org/Belgeler/TURKIYE_REKOLTE_RAPOR_2017_2018.pdf).
- Ünal K., Nergiz C., 2003. The Effect of Table Olive Preparing Methods and Storage on the Composition and Nutritive Value of Olives. *Grasas y Aceites*, 54(1): 71-76.
- Wang Y.Z., Ju X.L., Zhou Y.G., 2005. The Variability of Citrinin Production in *Monascus* Type Cultures. *Food Microbiology*, 22 (1): 145-148.
- Wang C, García-Fernández D, Mas A, Esteve-Zarzoso B. 2015. Fungal Diversity in Grape Must and Wine Fermentation Assessed by Massive Sequencing, Quantitative PCR and DGGE. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1156.
- Wawrzyniaka J., Waśkiewicz A., 2014. Ochratoxin A and Citrinin Production by *Penicillium Verrucosum* on Cereal Solid Substrates. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(1): 139-148.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322 p.

- Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., Scot D.B., Theron J.J., 1965. Ochratoxin A, a Toxic Metabolite Produced by *Aspergillus ochraceus*. *Wilh. Nature.*, 205: 1112-1113.
- Vázquez-Velasco M., Díaz L.E., Lucas R., Gómez-Martínez S., Bastida S., Marcos A., Sánchez-Muniz F.J., 2011. Effects of Hydroxytyrosol-enriched Sunflower Oil Consumption on CVD Risk Factors. *British Journal of Nutrition*, 105(10): 1448-1452.
- Vega F.E., Posada F., Peterson S.W., Gianfagna T.J., Chaves F., 2006. *Penicillium* Species Endophytic in Coffee Plants and Ochratoxin A Production. *Mycologia*, 98(1): 31–42.
- Vinha A.F., Ferreres F., Silva B.M., Valentao P., Goncalves A., Pereira J. A., Oliveira M. B., Seabra R. M., Andrade P. B., 2005. Phenolic Profiles of Portuguese Olive Fruits (*Olea europaea* L.): Influences of Cultivar and Geographical Origin. *Food Chemistry*, 89: 561–568.
- Visconti A., Logrieco A., Bottalico A., 1986. Natural Occurrence of Alternaria Mycotoxins in Olive: Their Production and Possible Transfer into the Oil. *Food Additives and Contaminants*, 3: 323-330.
- Visioli F., Bellomo G., Galli C., 1998. Free Radical-scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(1): 60-64.
- Vural A., Arserim Kaya N.B., Mete M., 2004. Bazı Öğütülmüş Baharatlarda Küf ve Maya Florasının İncelenmesi. *Dicle Tıp Dergisi*, 31(3): 15-19.
- Yang G., Rase M.S., Turgeon B.G., Yode O.C., 1996. A Polyketide Synthase 1s Required for Fungal Virulence and Production of the Polyketide T-Toxin. November 1996 O 1996 American Society of Plant Physiologists, the *Plant Cell*, 8: 2139-2150.
- Yıldırım Ş., 2009. Sofralık Siyah Zeytinde Aflatoksinamik Küf Gelişimi ve Aflatoksin Oluşumuna *Lactobacillus Plantarum* ve Bazı Ekstraktların Etkileri. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Tekirdağ.
- Zorlutuna D., 2012. *Penicillium verrucosum*'un Siyah ve Yeşil Zeytinlerde OTA ve CIT Üretme Yeteneğinin İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.

Zubair A., Ud-Din Z., Saleemullah, Khan S.A., Shah H.U., Khan B.A., Ali E., 2011. Fatty Acid Profile and Aflatoxin Contamination of Walnuts (*Juglans Regia*). Arpn Journal of Agricultural and Biological Science, 6(9): 1-8.

ZEA (Zeytin Araştırma Enstitüsü), Erişim tarihi: 20.09.2014. Erişim adresi:  
<http://www.zae.gov.tr>.

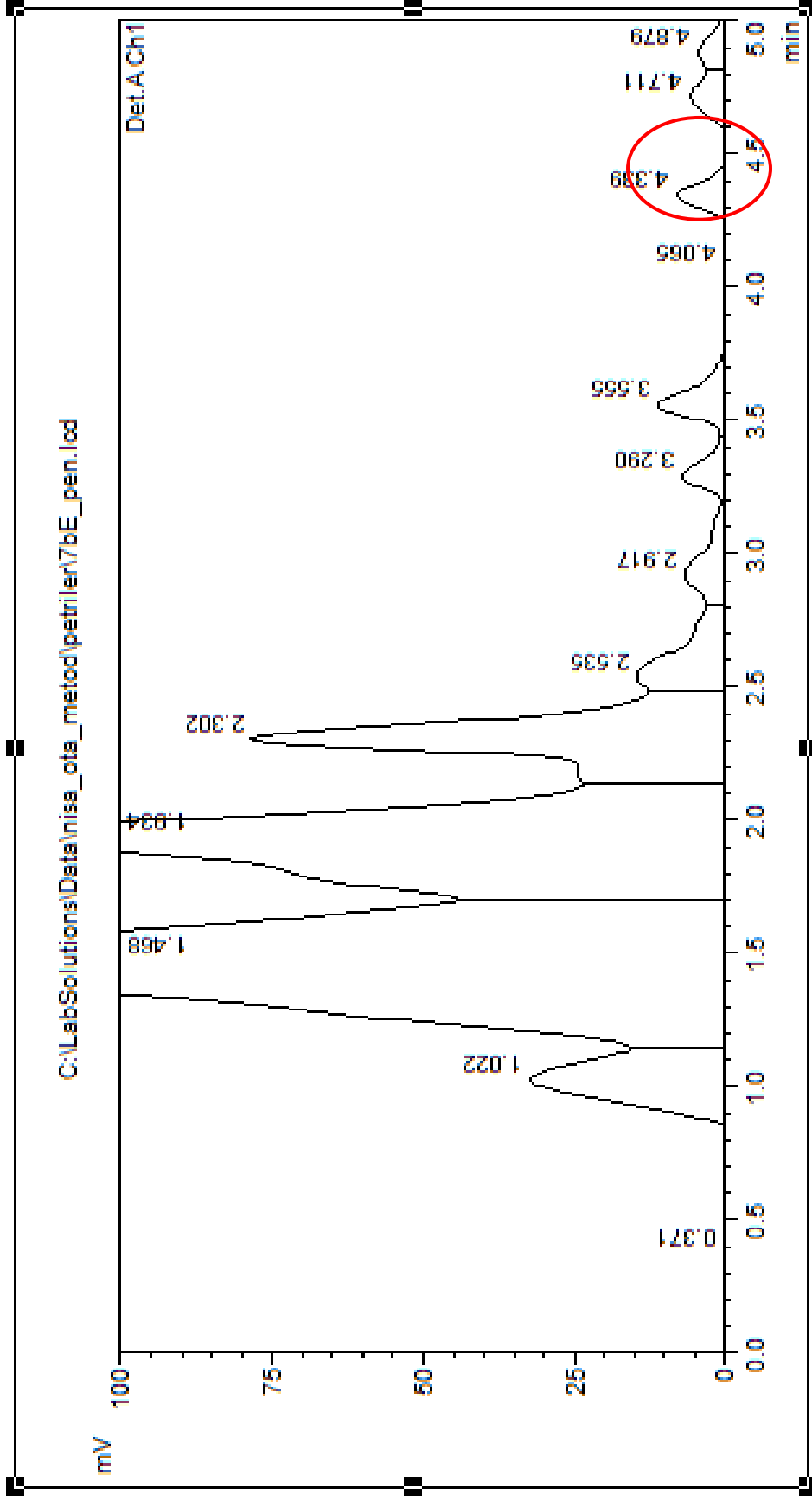




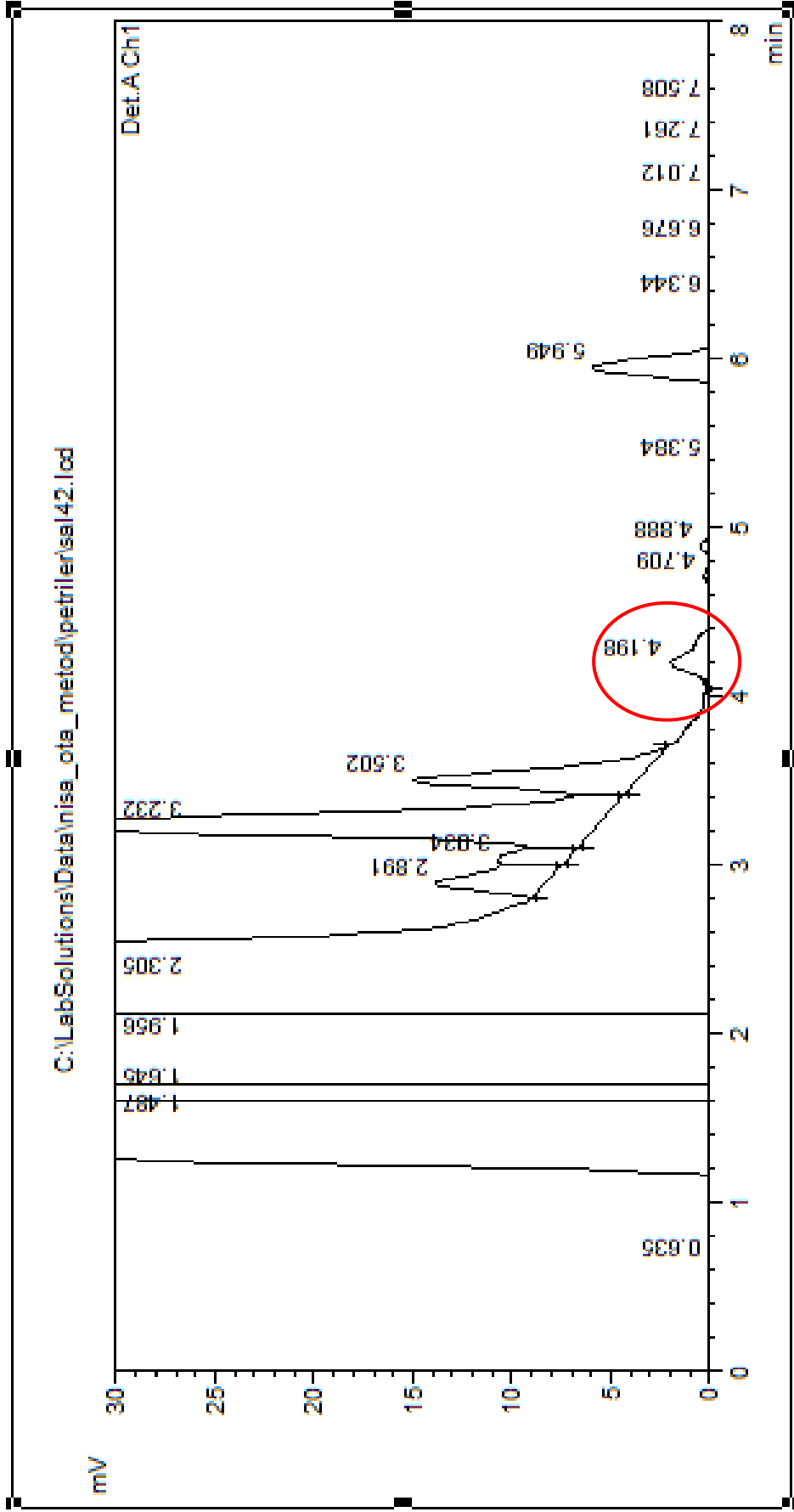


**EKLERİ**

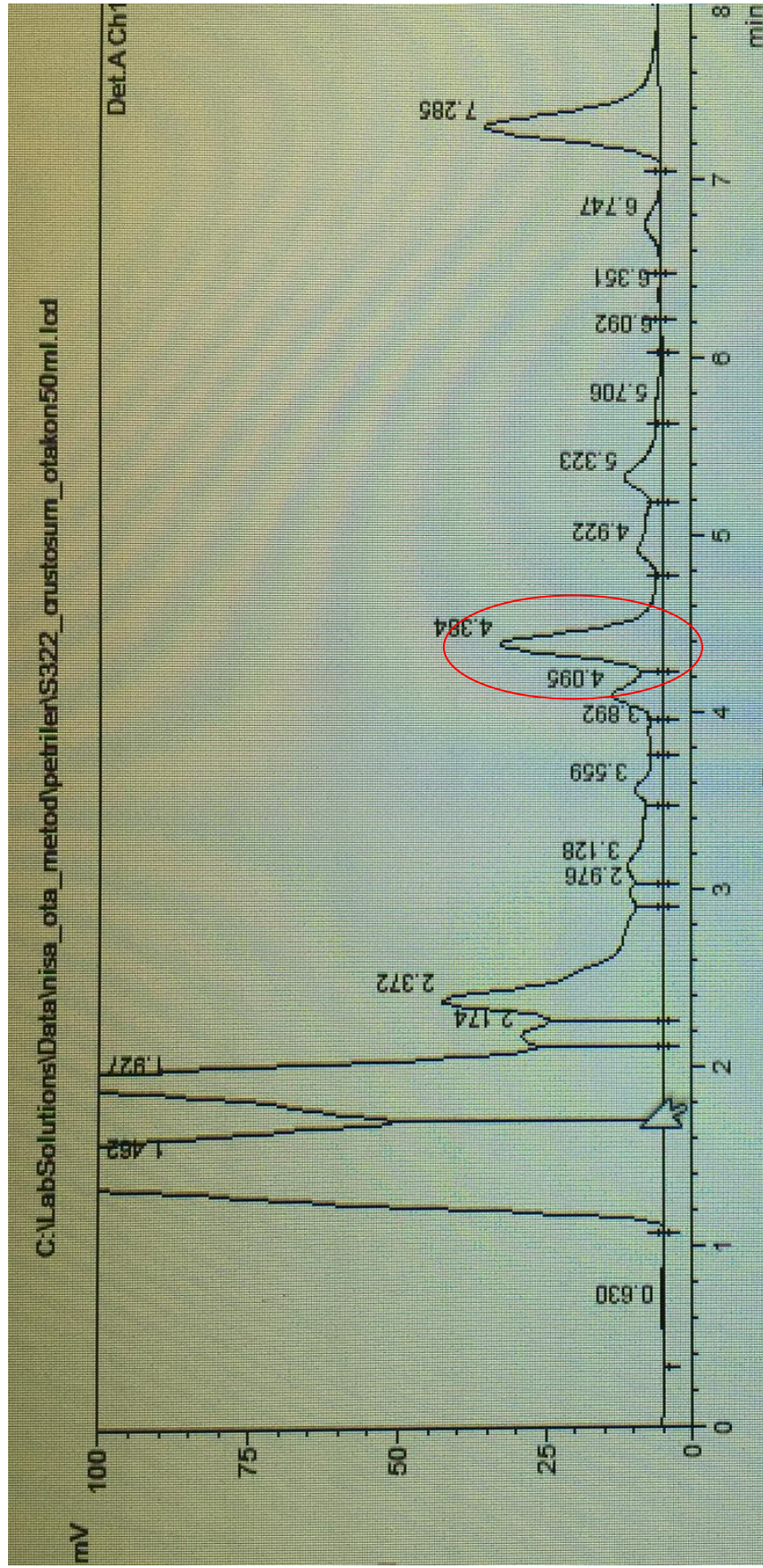
EK 1. YES Agar Toksin Analizi (OTA) Kromotogram Görüntüsü



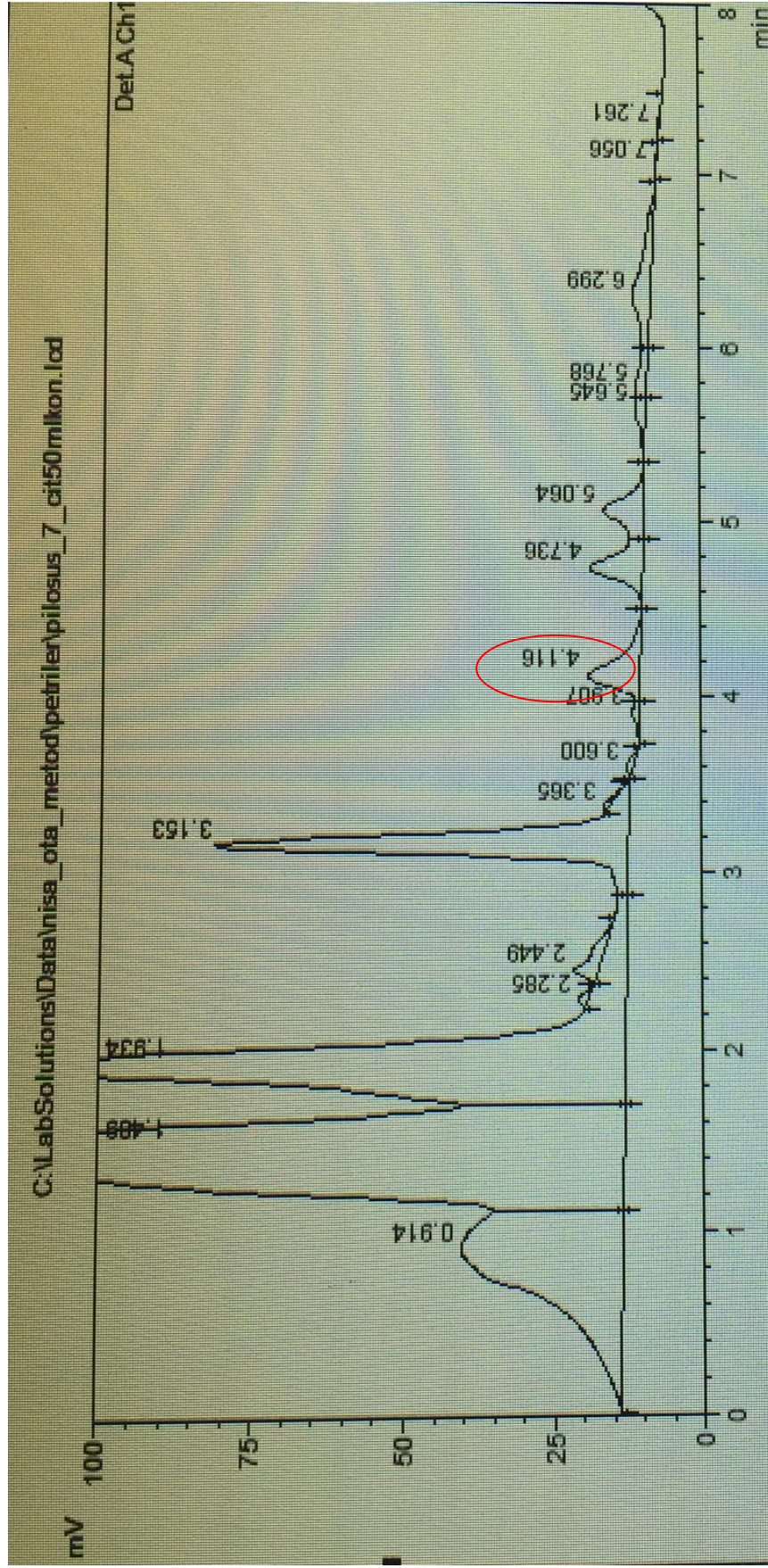
EK 2: YES Agar Toksin Analizi (CIT) Kromotogram Görüntüsü



EK 3: Okratoksin Standardı İle Kontamine Edilmiş YES Agar Ortamında Geliştirilmiş HPLC Kromotogramı

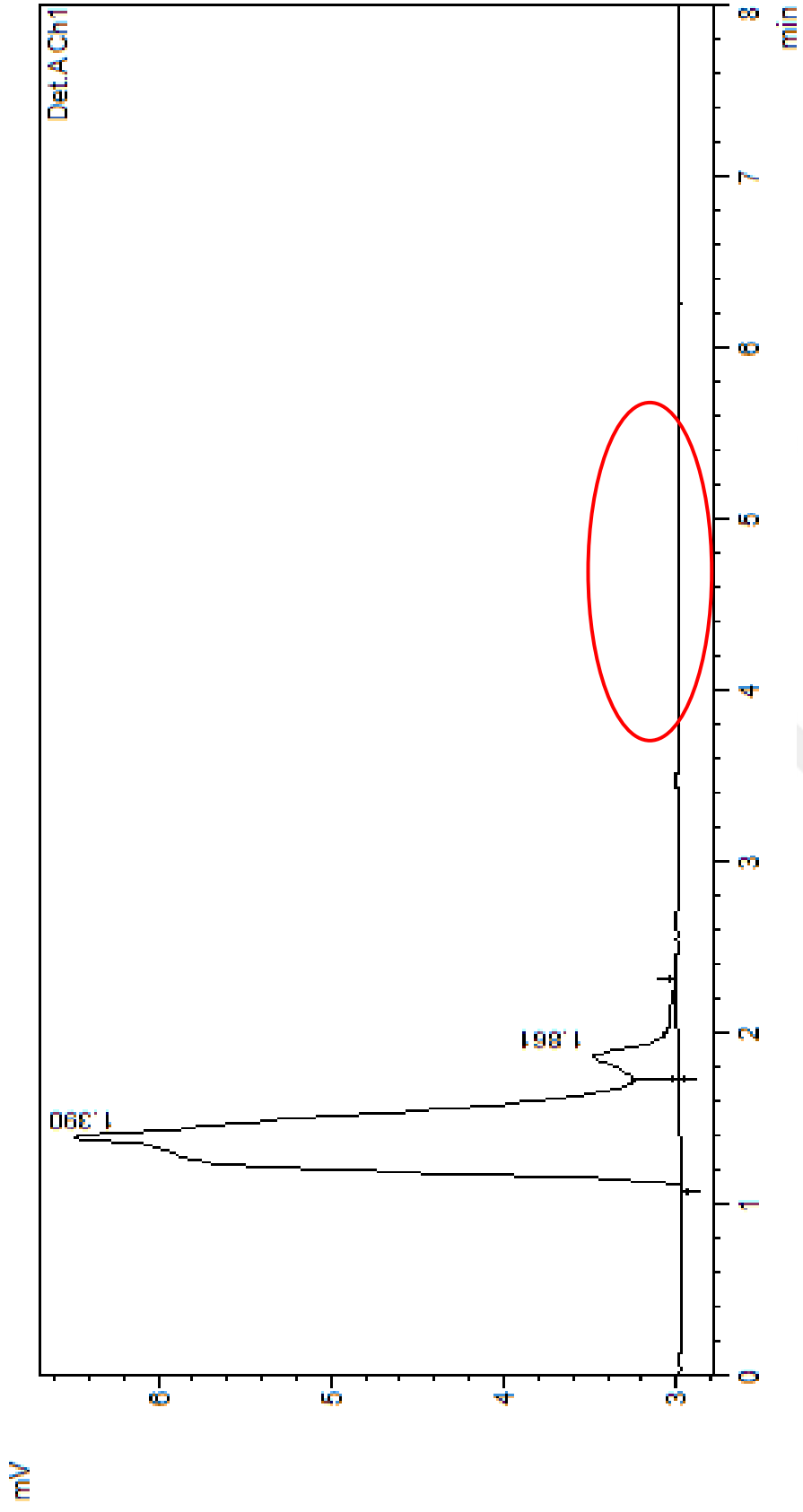


EK 4: CIT Standardı İle Kontamine Edilmiş YES Agar Ortamında Geliştirilmiş HPLC Kromatogramı

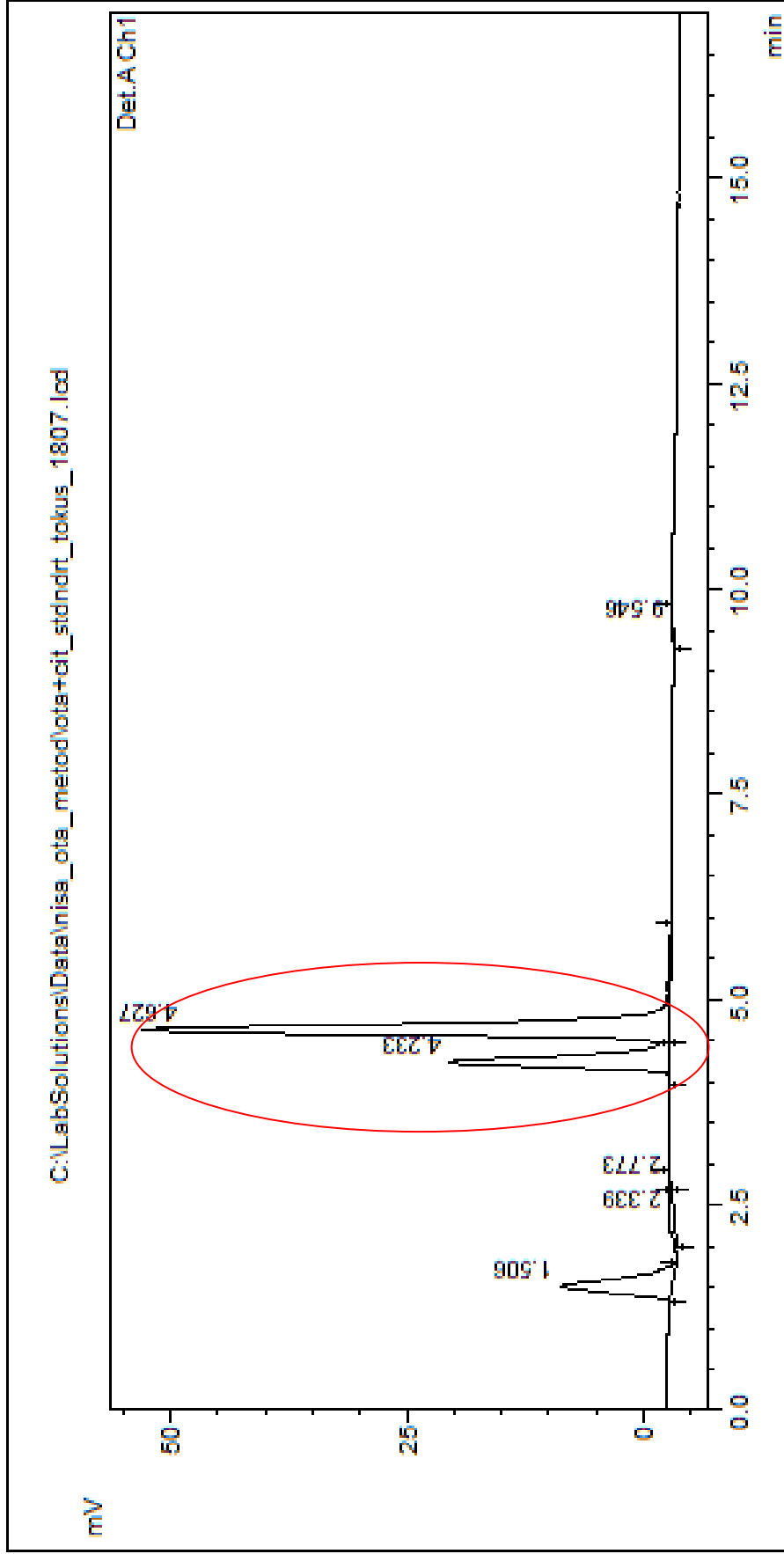


EK 5: Zeytinde Toksin Analizi Kromotogram Görüntüsü

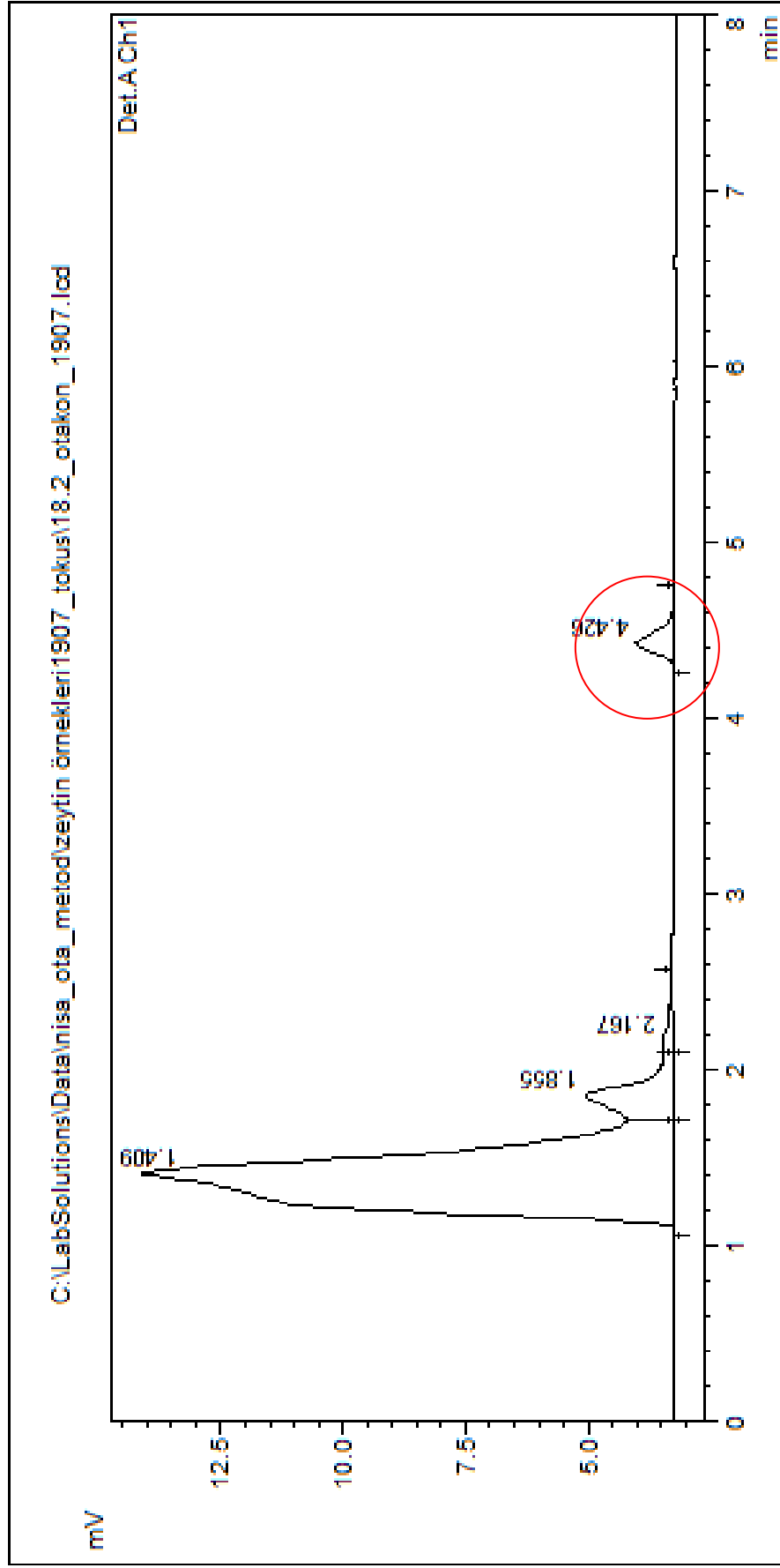
C:\LabSolutions\Data\Nisa\_ota\_metod\zeytin örnekləri1907\_tokus\18.2\_1907\_tokus.lod



EK 6: OTA ve CIT Standardı İle Kontamine Edilmiş Zeytin Ekstraksiyonunun HPLC Kromatogramı

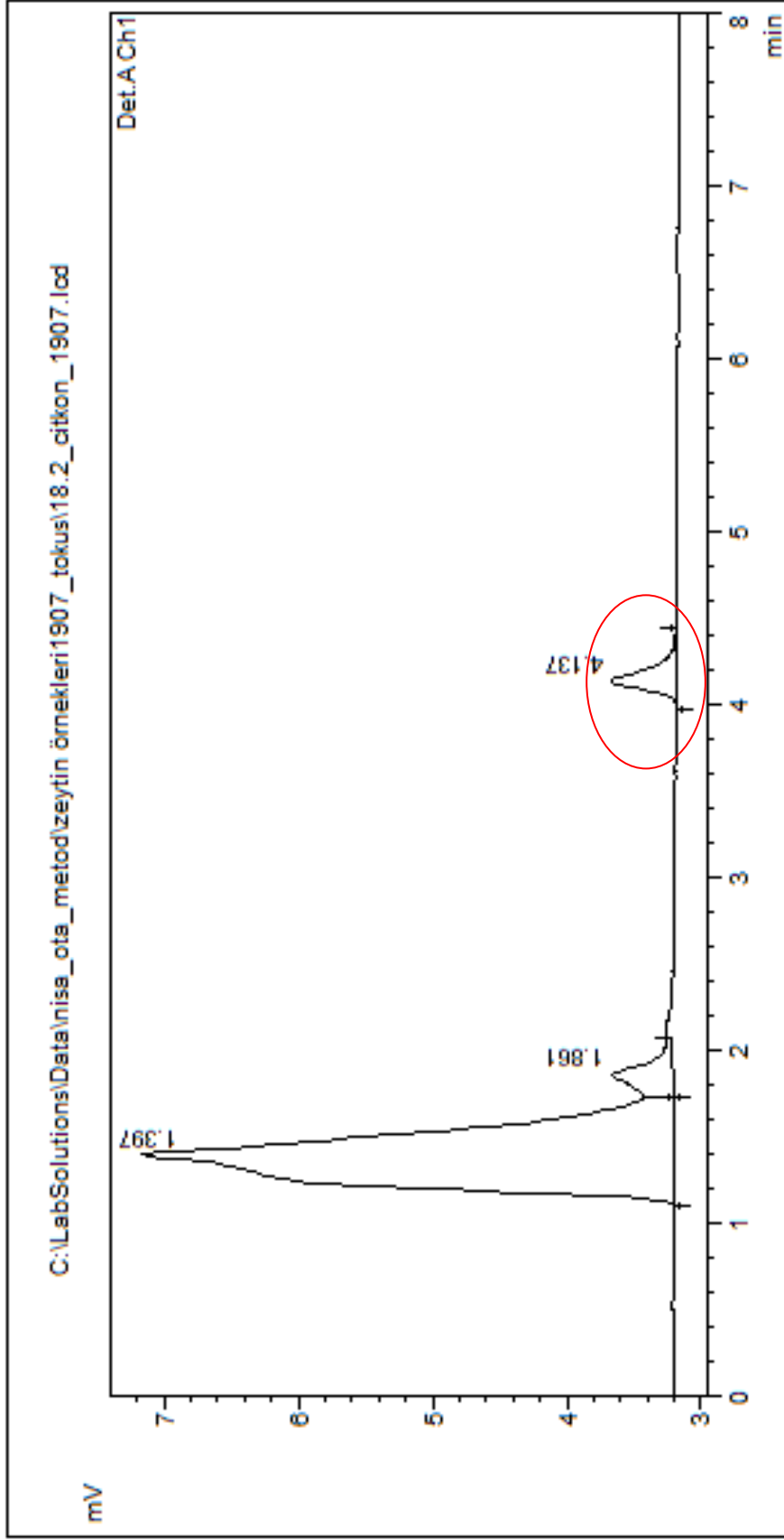


EK 7: OTA Standardı İle Kontamine Edilmiş Zeytin Ekstraksiyonunun HPLC Kromotogramı





EK 8: CIT Standardı İle Kontamine Edilmiş Zeytin Ekstraksiyonunun HPLC Kromotogramı



EK 9: Sekans Analizi İle Tanımlanan Türlerin Baz Dizilimleri

***Alternaria alternata:***

CTACAACGGCACTTCAGACCTCCAGTTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCA  
ACGAAGTACGTCACTCGATATTCATACGGCAGATAAAAGGCCAATACT  
GATCTATAGCAGGGCGTCCAACAACAAGTTCGTGCCCGTGCCGTCCCTCGT  
CGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGCGCTGGTCCCTTCGGCC  
AGCTGTTCCGCCCTGACAACTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGTGCTGGTAAC  
AACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

***Penicillium crustosum:***

CATCTCTGGCGAGCACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTTTAACAG  
TGATAGGGGTTTCCGGTGGATTACACATCTGATATCTTCCTAGGTACAAT  
GGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACCATGT  
GAGTCCAACGACAGGAAACCGAATAATAGTGCATCATCTGATCGGATGT  
TTTCCTTGATAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTT  
CTCGTCGATTTGGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCCTT  
CGGCAAGCTTTTCCGCCCCGACAACTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCTG  
GTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTAAAA

***Penicillium roquefortii:***

GATAAGGCAACAGGACTGAACGAGACGAAGTTATCGGGGCGGAAAAGC  
TTGCCGAAAGGACCAGAGCGGACGGGTCATGGTACCGGGCTCCAAATCG  
ACCAGAACGGCACGGGGAACGTACTIONTGTACCGCTGGCCTAGATTAAGA  
AAAAAAAAATCCGATCAGATGGTGCACGCTTAATCAATGCCCAGTCGCGG  
TACTCACATGGTTGAAGTAGACGTTTCATACGCTCGAGCTGGAGGTCGGAG  
GTTCCATTGTACCTAGCAAGATATTAGACATGTGAACCACGGAAAGCCC  
ATCATCTTTAGACTTACTGTCCATCGCCATCGAGACCGTGCTCTCCAGAA  
ATGGTTTGCCTGTAATGTAGTTAGTAATTTGTCAATTGGTACCCAACGCG  
AAAAAAAGGCTCGGCACTTACCAGAAAGCAGCACCGATTTGGTTACCCA  
A

***Penicillium expansum:***

TCCAAATCGACGAGAACGGCACGGGGAACGTA CT TGT CACCGCTGGCCT  
AGATTATCAAAGAAAAAGATCCGATCAGATGATGCACGATTATTCGGTA  
ACTAGTCGGTGTACTCACATGGTTGAAGTAGACGTT CATA CGCTCGAGCT  
GGAGGTCGGAGGTACCATTGTACCTAGCAAGATATCAGACGTGTGATCT  
ACTAGAAACCCATCACCGTTGAACTTACTGTCCATCACCATCGAGACCGT  
GCTCGCCAGAGATGGTTTGCCTGCAATCCAGTTAGTAAATTGTCAATTGA  
TACCCAACGCGAAAAAAAAGCTCGGCACTTACCAGAAAGCAGCACCGAT  
TTGGTTACACCA

***Penicillium glabrum:***

CTCCAAGTCGACAAGGACGGCACGGGGAACGTAACGGTTGCTGCTGGCC  
TATCAAGATAAACATTAGAGAAGCCTTTATACTTCTAACTTCAATTCCAC  
ACATACCTCGTTGAAGTAGACGTT CAT GCGCTCCA ACTGGAGGTCGGAAG  
CCTCGTTGACGCTAAAATTTATCAGACCGCCATTTCCACCTCGCAATCTC  
ATCGATGTTGGAACTCACTGTCCATCACCATCAAGTCCGTGCTCGCCAG  
CAATGGTTTGCCTAGAAATCAGTCAGTGATTCGGTCCAACAGGCTATCAA  
TTGGTGATCGTGGTTGCAACACGTACCAGAAAGCAGCACCGATTTGGTTA  
CCA

***Penicillium brevicompactum:***

ACTTGT CACCACTAGCCTGGGCGGTCAAGAATATGAGGTGAGAAAATGC  
ACAACCAGAGTTCTT CACATCATTGTACTCACATGGTTGAAGTAGACGTT  
CATA CGCTCGAGCTGGAGGTCGGAGGTGCCATTGTACCTAACAAGATCTC  
AGACCCAATCCACGCGTAATTCGAACACAGTCGTCCACTTACTGTCCATC  
GCCATCGAGACCGTGCTCGCCGGAGATAGTTTGCCTTTGAGCCAGTTAGC  
AAATTGTCAATTGATACTCAGCCATAGCGGGAAAAAGAAAAAGACATGGT  
GCGATACATAACCAGAAAGCAGCACCGATTTGGTTACCACA

***Aspergillus niger:***

GTGCTGCTTTCTGGTACGTATAACAACCTGCCATTGGATTGGGGGATGGAAC  
ATCGTCTCTTAGGCTATCTCAGCTTGAGTTCAGATGTTGTCCATTAGGTAC  
ATGCTATCGGTCTAAGAACACGTCTAACAATTCAACAGGCAGACCATCTC  
TGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACA  
CCTCTCAATTGGTCAACAATGGGCAAAGGGTTGGGTCTTCTGACACGCAG  
GATAGTTACAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTA  
CTTCAACGAGGTGAGATCCATCGGACCTTGGCTTTTTTCACGACAATATCA  
TCAATGTCCTAATCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTTCCCTCG  
TGCCGTCCTCGTCGACCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCG  
GTCCTTTCGGCCAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCG  
GTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACA

***Aspergillus tubingensis:***

AGCTATCGGGTTAAGAACACGTCTAACAACCTCAACAGGCAGACCATCTCT  
GGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTTCACAC  
CTCTCAATTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGG  
ATAGTTACAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTAC  
TTCAACGAGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTTCACGACAATATCA  
TCAATGTCCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCG  
TGCCGTCCTCGTCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCG  
GTCCCTTCGGCCAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCG  
GTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTAACCTGGGAGGGGTAA

***Monascus pilosus:***

AGGAGTACATTCCTGGTGGATGAGGTTCCAGCTGTTCTTTCGTGTTTTCTG  
GGGTCGAGTTTTTGCTGACTTGTTCTTTTATAGGCAGAACATCTCTGGTGA  
GCACGGCCTTGATGGCTCCGGTGTGTAAGTAGAACCTTTTCCATCTATC  
TCAAGGCATTGTGCAGGGTGTGAGGGGGAAAGGGGCATCAATGTCTAAT  
GTGATAACAGCTACCATGGTACTTCCGACCTTCAGTTGGAGCGTATCAAC  
GTTTACTTCAACGAGGTTTCGTCTGTGATGGATTCTTCCATGTAGAGC  
GCCTTTCTGATAATTCGATTAGGCCAGTGGTCAGAAGTACGTTCCCTCGT  
GCCGTCCTGGTCGACCTCGAGCCCGGTACCATGGATGCCGTCCGTGCTGG  
TCCCTTCGGTGAACCTTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGG

TGCTGGTAACAACACTGGGCCAAGGGTCACTAA



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nisa ÖZSOY

Doğum Yeri : Üsküdar/İSTANBUL

Doğum Tarihi : 24.08.1985

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, 2003-2008.

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 2009-2012.

Doktora Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 2012-2019.

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar -SCI -Diğer

Özsoy N., Özkılınç H., Uysal Pala Ç., 2017. Molecular Characterization of Natural Fungal Flora in Black Olives from Field to Table. Turkish Journal of Agriculture, vol 5(8): 944-949.

#### b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

Özsoy N., Yasar K., 2012. 23 rd. Effect of Heat Treatment on Microbiological Quality of Ezine Cheese. International ICFMH Symposium, Food Micro2012, TÜRKİYE, 3-7 Eylül, vol.1, no.1, pp.

Yasar K., Özsoy N., 2012. Effect of Heat Treatment on Proteolysis of Ezine Cheese. IFT12 (Institute of Food Technologists) Annual Meeting and Food Expo, Las Vegas, Nevada, ABD, 25-28 Haziran 2012, pp. 254-255.

Özsoy, N., Ünal, S., Özkılınç, H., Uysal Pala, Ç. 2015, "Kuru Gıda Örneklerinden Mikotoksik Fungal Türlerin İzolasyonu Ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması", Pamukkale Gıda Sempozyumu III: Kurutulmuş ve Yarı Kurutulmuş Gıdalar, 13-15 Mayıs 2015, Denizli (Poster Bildiri).

Özsoy N., Pala Ç., Özkılınç H., 2016, 'Changes in Phenolic Profile And Antioxidant Activity Of Black Table Olives During Fermentation Process', 10<sup>th</sup> Aegan Analytical Chemistry Days, Çanakkale, Turkey, 29 September-2 October 2016.

Özsoy N., Uysal Pala Ç., Özkılınç H., 2017. Molecular detection of fungal species in black olives by tracking from field to table. 2nd International Balkan Agriculture Congress, 16-18 May, 2017, Tekirdağ, TURKEY.

c) Katıldığı Projeler

Yaşar, K., Özsoy, N., (2010-2012, Yürütücü). Isıl İşlemin Ezine Peynirinin Özellikleri Üzerine Etkisi (ÇOMU BAP 2010/256).

Pala Ç., Özsoy N., (2015-2017, Araştırmacı). Sofralık Siyah Zeytin İşleme Sürecinde Mikotoksik Fungal Türlerin Moleküler Karakterizasyonu ve Toksin Oluşturma Potansiyelleri (Çomu Bap 2015/453).

**İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Özsoylar Süt Ürünleri: 2008-2012

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi: 2012- Halen

**İLETİŞİM**

E-posta Adresi : nisaoszoy@comu.edu.tr