



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEMLİK ÇEŞİDİ YEŞİL ZEYTİNİN FENOLİK BİLEŞENLERİNİN LC-
DAD-MS/MS İLE KARAKTERİZASYONU VE FERMANTASYON
İŞLEMİNİN BU BİLEŞENLER ÜZERİNE ETKİLERİ

AYŞE SUNA BEKMEZ
YÜKSEK LİSANS



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEMLİK ÇEŞİDİ YEŞİL ZEYTİNİN FENOLİK BİLEŞENLERİNİN LC-
DAD-MS/MS İLE KARAKTERİZASYONU VE FERMANTASYON
İŞLEMİNİN BU BİLEŞENLER ÜZERİNE ETKİLERİ

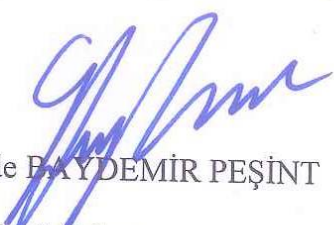
AYŞE SUNA BEKMEZ
YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
Prof. Dr. Haşim KELEBEK

ADANA 2019

GEMLİK ÇEŞİDİ YEŞİL ZEYTİNİN FENOLİK BİLEŞENLERİNİN LC-DAD-MS/MS İLE KARAKTERİZASYONU VE FERMANTASYON İŞLEMİNİN BU BİLEŞENLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Ayşe Suna BEKMEZ tarafından tamamlanan Yüksek Lisans Tezi onaylanmıştır.

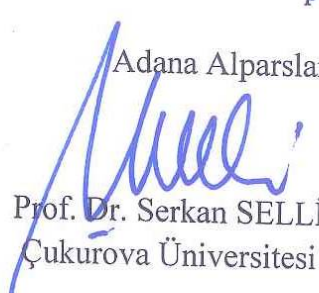

Doç. Dr. Gözde BAYDEMİR PEŞİNT
Enstitü Müdürü


Prof. Dr. Haşım KELEBEK
Anabilim Dalı Başkanı


Prof. Dr. Haşım KELEBEK
Danışman

Tez Jürisi


Prof. Dr. Haşım KELEBEK


Prof. Dr. Serkan SELLİ
Çukurova Üniversitesi


Doç. Dr. Aysun ŞENER GEDÜK
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji
Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi

26/07/2019

Bu tezde yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm bilgiler için atıf verdiğimi ve kaynak gösterdiğimi beyan ederim.


Ayşe Suna BEKMEZ

ÖZET

GEMLİK ÇEŞİDİ YEŞİL ZEYTİNİN FENOLİK BİLEŞENLERİN LC-DAD-MS/MS İLE KARAKTERİZASYONU VE FERMANTASYON İŞLEMİNİN BU BİLEŞENLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayşe Suna BEKMEZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Haşim KELEBEK

Mayıs 2019, 54 sayfa

Bu çalışmada, 2018 yılı Adana’da yetiştirilen yeşil Gemlik zeytininden salamura yöntemiyle sofralık zeytin üretiminde fenolik bileşik, antioksidan kapasite ve diğer önemli kalite parametrelerindeki değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Zeytinlerin fenolik bileşiklerinin analizleri LC-DAD-ESI-MS/MS cihazıyla ve antioksidan potansiyelleri DPPH ve ABTS metotları kullanılarak ayrıntılı olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarı taze zeytinde 10.74 mg/g, fermente zeytinde 10,34 mg/g olarak saptanmıştır. LC/MS-MS cihazıyla yapılan analizde taze ve fermente zeytin örneklerinde 21 adet fenolik bileşik tespit edilmiştir. Bu bileşiklerden en baskını taze zeytinde oleuropein iken fermente zeytinde luteolin ve hidroksitirozol olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda 6'-rhamnopyranozil oleozit bileşiği ilk defa belirlenmiştir. Salamura zeytinler kaffeik asit, hidroksitirozol, luteolin ve apigenin ile taze zeytinler ise karakterize olarak grup oluştururken diğer saptanan fenolikler taze zeytinleri ise verbaskozit, luteolin-7-glikozit, hidroksitirozol glikozit, elanolik asit türevi, oleuropein, 6'-rhamnopyranozil oleozit, rutin ve luteolin ile karakterize olmuştur. Çalışmada ayrıca, taze zeytinlerde glikozit yapının salamura zeytinlerde ise aglikon yapının baskın olduğu saptanmıştır. Genel olarak değerlendirildiğinde fenolik bileşiklerin toplam miktarı fermantasyona bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı ancak antioksidan kapasitedeki değişimin istatistiksel yönden önemli ($p>0.05$) olmadığı saptanmıştır. Bu durumun glikozit yapıları bileşiklerin antioksidan potansiyeli daha yüksek olan aglikon yapıları bileşiklere dönüşümünden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gemlik, Fermantasyon, Salamura zeytin, Fenolik bileşikler, Antioksidan aktivite, *Olea europaea*

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF PHENOLIC COMPONENTS OF GEMLIK VARIETY GREEN OLIVE WITH LC-DAD-MS/MS AND EFFECTS OF FERMANTATION ON THESE COMPONENTS

Ayşe Suna BEKMEZ

M.Sc. Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Hasim KELEBEK

May 2019, 54 pages

In this study, it was aimed to determine the changes in phenolic compound, antioxidant capacity and other important quality parameters in table olives production from green Gemlik olives grown in Adana in 2018. Analysis of phenolic compounds of olives was determined by LC-DAD-ESI-MS / MS instrument and antioxidant potentials were determined in detail using DPPH and ABTS methods. Total phenolic content was 10.74 mg/g in fresh olives and 10.34 mg/g in fermented olives. LC / MS-MS analysis of fresh and fermented olive samples revealed 21 phenolic compounds. The most dominant of these compounds was oleuropein in fresh olives, while luteolin and hydroxytyrosol were found in fermented olives. In addition, 6'-rhamnopyranosyl oleoside compound was determined for the first time in our study. The brined olives were characterized by caffeic acid, hydroxytyrosol, luteolin and apigenin, and fresh olives were characterized by verbascoside, luteolin-7-glycoside, hydroxytyrosol glycoside, elanolic acid derivative, oleuropein, 6'-rhamnopyranosyl oleoside, routine and luteolin compounds. In addition, it was found that glycoside structure was dominant in fresh olives and aglycone structure was dominant in brined olives. Overall, it was found that the total amount of phenolic compounds decreased significantly due to fermentation, but the change in antioxidant capacity was not statistically significant ($p > 0.05$). This is thought to result from the conversion of glycoside compounds into aglycone compounds with higher antioxidant potential.

Keywords: Gemlik, Fermentation, Brined olive, Table Olive, Phenolic compounds, Antioxidant activity, *Olea europaea*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni yönlendiren, kendisi ile çalışma fırsatı veren, engin bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen, yapıcı fikir ve önerileriyle araştırmalarımnda kolaylık sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Haşim KELEBEK'e;

Laboratuvar çalışmalarımnda yardımları ve sohbetleriyle bana destek olan hocam Öğr. Gör. Nurten CENGİZ ve arkadaşlarım Ceren İLĞAZ ve Özge AKSAY'a, yüksek lisans ve doktora öğrencileri olan Hatice Kübra ŞAŞMAZ ve Türkan UZLAŞIR'a;

Yüksek lisans eğitimimim için beni teşvik eden, sadece çalışmalarım sırasında değil, tanıştığımız günden itibaren her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen arkadaşım Zahide Rüveyda SERTKAYA'ya da yaşamıma kattığı renkten dolayı;

Son olarak eğitimim ve daha da önemlisi hayatım boyunca beni anlayış ve hoşgörü ile karşılayan, maddi ve manevi yardımları ile destek olan canım aileme, özellikle kardeşim Fatih'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez projesi 18332009 numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Yüksek lisans projemizi destekleyerek uygun şekilde yürütülmesini sağlayan Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi BAP birimine ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xii
KISALTMALAR.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Zeytinin Dünyada ve Türkiye'deki yeri.....	3
2.2. Zeytinin yapısı ve bileşenleri.....	5
2.3. Zeytinin Fenolik Bileşenleri.....	7
2.3.1. Fenolik Asitler.....	9
2.3.2. Fenolik Alkoller.....	10
2.3.3. Flavonoidler.....	10
2.3.4. Sekoiridoitler.....	11
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	15
3.1. Kimyasallar.....	15
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi.....	17
3.2.2. Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi.....	20
3.2.3. Toplam Fenolik Madde Analizi.....	22
3.2.4. Şeker Analizi.....	23
3.2.5. Zeytinlerde Genel Bileşim Analizleri.....	25
3.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler.....	26
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	27
4.1. Taze ve Fermente Zeytinin Genel Bileşimleri.....	27
4.2. Taze ve Fermente Zeytinin Fenolik Bileşenleri.....	32
5. SONUÇLAR.....	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Zeytin tanesinin yapısı.....	6
Şekil 2.2. Gıdalarda bulunan fenolik asitler.....	9
Şekil 2.3. Zeytinde bulunan başlıca fenolik alkoller.....	10
Şekil 2.4. Flavonidlerin yapısı.....	11
Şekil 2.5. Oleuropein'in hidrolizinin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 3.1. Kırma yöntemi ile zeytin üretim aşamaları.....	16
Şekil 3.2. Sofralık Gemlik zeytini.....	17
Şekil 3.3. Analizlerde kullanılan HPLC-ESI-DAD-MS/MS.....	18
Şekil 3.4. HPLC analizlerinde kullanılan elüsyon sistemi.....	19
Şekil 3.5. Zeytinlerde fenolik bileşiklerin ekstraksiyon işlemi.....	20
Şekil 3.6. DPPH ve ABTS yöntemleriyle antioksidan kapasite analizleri.....	21
Şekil 3.7. Analizlerde kullanılan UV-Vis spektrofotometre.....	22
Şekil 3.8. Toplam fenolik bileşik analizinde kullanılan gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	23
Şekil 3.9. Sakkaroz için kalibrasyon eğrisi.....	24
Şekil 3.10. Glikoz için kalibrasyon eğrisi.....	24
Şekil 3.11. Fruktoz için kalibrasyon eğrisi.....	25
Şekil 3.12. Zeytinlerde renk bileşim analizi.....	26
Şekil 3.13. Zeytinlerde tuz tayini işlemi.....	26
Şekil 4.1. Hidroksitirole ait LC-MS/MS spektrumu.....	32
Şekil 4.2. Kafeil aside ait LC-MS/MS spektrumu.....	33
Şekil 4.3. Luteoline ait LC-MS/MS spektrumu.....	36
Şekil 4.4. İki ana bileşen için taze ve salamura zeytin fenoliklerinin PCA sonuçları.....	42

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Sofralık Zeytin Üretimi(bin-ton)	5
Tablo 2.2. Zeytinin ortalama kimyasal bileşimleri.....	7
Tablo 2.3. Zeytinde bulunan fenolik bileşikler.....	8
Tablo 4.1. Taze ve Fermente zeytinin genel bileşimleri.....	31
Tablo 4.2. Zeytindeki fenolik bileşiklerin alıkonma zamanı (Rt), dalga boyu (DAD) ve LC-DAD-ESI-MS kullanılarak elde edilen kütle spektral verileri.....	34



KISALTMALAR

ABTS	: (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
DAD	: Diyod Array Dedektör
DPPH	: (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
Fer	: Feruloil
FLVs	: Flavonoller
FRAP	: Ferrik iyon indirgeme antioksidan parametresi
Gal	: Galaktozit
Gli	: Glikozit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LAB	: Laktik asit bakterileri
LC-DAD-ESI-MS/MS:	Triple Quadrupole kütle spektroskopili yüksek performanslı sıvı kromatografisi
Phen	: Fenol
RID	: Refraktif İndeks Dedektörü (Kırma İndisi Dedektörü)
TA	: Titrasyon asitliği
Trolox	: (+/-) 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asit
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü
CA	: Kafeik asit
Quer	: Kuersetin

1. GİRİŞ

Zeytin (*Olea europaea* L.), Oleaceae familyasına ait meyvesi yenen, küçük bir ağaç türüdür. Antik çağlardan beri, zeytin meyveleri, Akdeniz havzasında ve Orta Doğu'da yaşayanlar için önemli bir gıda maddesi olmuştur. Sofralık zeytin ve zeytinyağı kaynağı olarak, meyve önemli ekonomik ve besinsel değere sahiptir (Rapoport ve arkadaşları, 2016). Sofralık zeytine işlenen zeytinler, genellikle et miktarı fazla, çekirdeği etinden kolayca ayrılabilen, şeker oranı yüksek iken yağ oranı tercihen düşük zeytin çeşitleridir (Tunalıoğlu, 2009). Sofralık zeytin, bitki kökenli fermente ürünlerden en popülerlerinden biridir. Besin değerinin yüksek olmasının yanı sıra lifler, amino asitler, doymamış yağ asitleri, vitaminler, doğal fenolik bileşikler ve antioksidan bileşiklerdeki içerikleri nedeniyle sofralık zeytinlerin önemli bir fonksiyonel besin olduğu düşünülmektedir (Heperkan ve arkadaşları, 2009). Sofralık zeytin fenolik fraksiyonu taze meyve eti ağırlığının %1 ila %3'ü arasındadır ve 36'dan fazla farklı bileşik içerebilir; bu fenolik fraksiyonun bileşimi, işleme yöntemine, çeşidine, tarımsal uygulamalara ve zeytinlerin olgunlaşma derecesine bağlı olarak hem nitelik hem de miktar bakımından değişebilir (Charoenprasert ve arkadaşları, 2012). Zeytinin işleme sonrası sahip olduğu duyuşal özelliklerle, sofralık zeytinin kendine has duyuşal karakteri ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde 90'ın üzerinde zeytin çeşidi bulunmaktadır ve bu çeşitler içerisinde sofralık zeytin üretimi için Gemlik zeytini büyük önem taşımaktadır (Aktan ve Kalkan, 1999). Meyve ve çekirdekleri orta irilikte oldukları için genellikle yeşil veya siyah sofralık zeytin üretiminde kullanılır. Gemlik zeytininin diğer zeytin çeşitlerine göre daha yüksek protein, yağ, şeker içeriği ve daha yüksek pH değeri ve daha düşük asitlik içerdiği bildirilmiştir. Bu çeşidin meyveleri yaklaşık olarak %30 yağ içerir (Dıraman, 2007). Gemlik yoğun periyodite göstermez; yüksek adaptasyon kapasitesine ve soğuk/hastalık direncine sahiptir. Hem sofralık zeytin hem de zeytinyağı şeklinde tüketilmek üzere kolayca işlenir. Aslında Marmara kökenli olan Gemlik çeşidinin ekim alanı, son 20 yılda ülke genelinde genişlemiştir ve genişlemeye devam etmektedir. Bu artışa sebep olarak devlet kurumlarının ve özel sektörünün Gemlik çeşidi fidanlarının üretilmesini teşvik etmesidir. Sofralık zeytin işlemenin temel amacı, meyvelerin kendi bileşiminde bulunan oleuropein'den kaynaklanan doğal acılığını ortadan kaldırmak ve ayrıca onları mikrobiyolojik bozulmalardan korumaktır (Garrido ve arkadaşları, 1997). Oleuropein, yeşil zeytinlerde en bol bulunan fenolik bileşiktir ve meyvenin acı tadından ve zeytinin işlenmesinden önce tatsız olmasından sorumludur (Othman ve arkadaşları, 2009). Tat ve kalitede farklılık oluşması ve ortaya çıkan acılığı azaltmak için sofralık zeytinler farklı işleme teknikleri kullanılarak üretilir. Meyve ve sebzelerin laktik asit

fermantasyonu ile muhafaza edilmesi uzun yıllardır uygulanan, bir gıda koruma yöntemidir. LAB tarafından gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu sonucu üretilen fermente gıda ürünleri arasında zeytin önemli bir yere sahiptir (Tokatlı ve arkadaşları, 2012). Salamura, turşu ile özdeşleşmiş bir terim olmakla birlikte, laktik asit fermentasyonu ile dayanıklı hale getirilen tüm fermente meyveler ve sebzeler için kullanılmaktadır (Kabak ve Dobson, 2011). Bitkisel kökenli bu substratların doğal mikroflorasında, laktik asit fermentasyonunu gerçekleştiren LAB'nin yanı sıra *Pseudomonas*, *Erwinia* ve *Enterobacter* türlerine ait bozulma yapan aerobik bakteriler, maya ve küfler gibi arzu edilmeyen mikroorganizmalar da yer almaktadır (Breidt ve arkadaşları, 2013). Ancak, fermentasyonun başlangıcında sayıları oldukça düşük olan LAB, yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek asitlik ve düşük pH (<4.5) ile karakterize edilen koşullara dayanabildiklerinden, endojen mikroflorayla rekabete girerek ortama hâkim olurlar. Bu zorlu ortam koşullarında koliform grubu bakteriler, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* ve LAB dışındaki diğer mikroorganizmalar inhibe olurlar (Hutkins, 2006). Salamura zeytin üretiminde LAB'nin ortama hâkim olması için su aktivitesi, sıcaklık, anaerobik ortam, tuz konsantrasyonu ve asitlik gibi uygun çevresel koşullar ayarlanırken, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimi engellenmiş olur (Russo ve arkadaşları, 2017). Ülkemizde genel olarak sofralık yeşil zeytin işleme yöntemleri, İspanyol yöntemi, Kıрма yöntemi ve Çizme yöntemi olmak üzere üç çeşittir (İrmak ve arkadaşları, 2010). Kıрма ve çizme yönteminde zeytinler, İspanyol yönteminden farklı olarak alkali ile acılık giderme işleminin yerine, zeytinler belirli bir orandaki (%6-8) salamura suyuna konularak işlenir. Zeytin işleminde birçok yöntem bulunmasına rağmen salamura yöntemiyle uygulanan proses önemli bir paya sahiptir. Ancak zeytinlerin salamura yöntemiyle işlenmesinin fenolik bileşik ve antioksidan kapasitesi üzerine etkilerini konu alan kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, Gemlik zeytinleri ve bu zeytinlerden elde edilen salamura zeytinlerin fenolik bileşikleri çok hassas bir teknik olan LC-DAD-ESI-MS/MS cihazı yardımıyla ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir. Öte yandan, zeytinlerin antioksidan potansiyelleri DPPH ve ABTS yöntemleriyle saptanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Zeytinin Dünya ve Türkiye’deki Yeri

Zeytin ağacı, Akdeniz havzasının ılıman ikliminde yetişen, dünyanın tropik ve sıcak ılıman bölgelerine özgü, dört mevsim yaprağını dökmeyen küçük bir ağaçtır. Meyvesiyle ünlü olan zeytin ağacı ticari açıdan önemlidir. Zeytin meyvesinden elde edilen, “sofralık zeytin ve zeytinyağının” dünya ticaretine ayrılan kısım %20 civarındadır. Dünya’da yaklaşık 900 milyon zeytin ağacı, 10 milyon hektar alanda yetiştirilmektedir. Dünya zeytin üretimi bazı ülkelerde yoğunlaşmıştır. Bu üretim ve ülkeler sırasıyla yaklaşık olarak İspanya (%26), İtalya (%23), Yunanistan (%15) ve Türkiye (%9)’dır. Türkiye’de toplam 8.461 (bin da) zeytinlik alanı, 174.594 bin adet zeytin ağacı, 2.100.00044 adet zeytin üretimi mevcuttur ve üretilen zeytinler içerisinde 460.000 kadarı sofralık zeytin olarak işlenmektedir (TÜİK, UZZK, 2018 Temmuz).

Sofralık Zeytin

Türk Gıda Kodeksi Sofralık Zeytin Tebliğinde (2014/33) Sofralık zeytin “Kültüre alınmış zeytin ağacı (*Olea europaea* L.) meyvelerinin tekniğine uygun olarak acılığının giderilip, fermentasyona tâbi tutularak veya tutulmayarak gerektiğinde laktik asit ve/veya diğer katkı maddeleri ilave edilen, pastörizasyon veya sterilizasyon işlemine tabi tutularak veya tutulmadan elde edilen zeytin” olarak tanımlanmaktadır. Fermentasyon, sebzeleri korumak için eski bir yöntemdir ve lezzet, raf ömrü, doku gibi birçok gıda özelliğinden sorumludur. Zeytin fermentasyonu, diğer doğal sebze fermentasyonları gibi, hammaddede ve işleme ortamında bulunan mikroorganizmalara dayanan, kendiliğinden gerçekleşen geleneksel bir laktik asit fermentasyonudur (Fernández Díez, 1983; Brenes ve arkadaşları, 1995). Yeşil ve siyah sofralık zeytinlerin fermentasyonu laktik asit bakterileri (LAB) ve mayaların bir arada olduğu bir süreçtir. Zeytinlerde bulunan LAB, ağırlıklı olarak *L. plantarum*, *L. casei*, *L. mesenteroides* gibi türlere aittir (Randazzo ve arkadaşları, 2004). Mayalar, yalnızca vitaminler, amino asitler ve pürinler gibi spesifik bileşikler üretmez, aynı zamanda LAB'nin büyümesi için çok önemli olan hidrokarbonları üretir. Bu sinerjistik simbiyoz, kontrollü ve kararlı bir fermentasyonun gelişimi için özellikle önemlidir (Bonatsou ve arkadaşları, 2017). Canlı organizmalarda meydana gelen reaksiyonların çoğu, kataliz olmadan yeterli oranda gerçekleştirilemez. Biyolojik reaksiyonların katalizörleri enzimlerdir (Madigan ve arkadaşları, 2010).

Laktik asit bakterileri (LAB) çeşitli fermente gıdaların üretiminde kullanılan endüstriyel açıdan önemli mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar ortamındaki karbonu metabolize ederek ara ürün olarak laktik asit üretmektedirler. LAB'nin bu özellikleri gıda hammaddelerinde asitliğin yükselmesine yol açarak gıdaların raf ömrünü uzatmakta ve çeşitli yeni tad ve aromadaki gıdaların üretimini mümkün kılmaktadır. LAB asit oluşturmalarının yanı sıra gıdalarda starter kültür olarak kullanıldıklarında tat, doku, besleyici değer gibi bazı ürün karakteristiklerine de katkıda bulunmaktadır (Kleerebezem ve Hugenholtz, 2003).

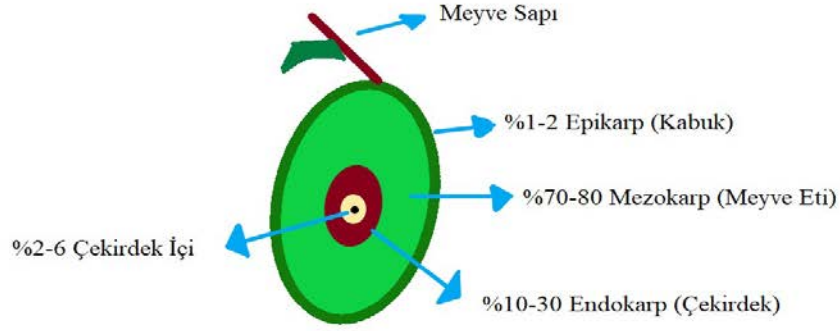
LAB fermantasyon sırasında oluşan ana ürünün (laktik asit) yanında fermente ürünlerin tatlarına ve aromalarına ve diğer duyuşal özelliklerine etki eden asetik asit, asetaldehit, etanol, diasetil, eksopolisakkarit ve seker alkoller gibi yan ürünleri de üretirler (Hylckama ve ark., 2007; Hugenholtz ve arkadaşları, 1999). LAB gelişim ortamında oksijene ihtiyaç duymaması, karbondioksit ve tuza tolerans gibi özelliklerinden dolayı çeşitli zeytin ve turşular gibi bitki kökenli çeşitli gıdaların fermantasyonunda (zeytinlerde ve turşularda) yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimatik aktivitenin araştırılması, mayaların ve LAB'nin başlangıç kültürleri olarak seçilmesinde büyük öneme sahiptir, çünkü bu mikroorganizmalar, çeşitli metabolitlerin ve ikincil bileşiklerin üretimi ile hammaddenin kalitesini artırabilir veya azaltabilir. Sofralık zeytinler söz konusu olduğunda, enzimler nihai ürünün kalitesi üzerinde hem olumlu hem de olumsuz bir etkiye sahip olabilir. En sık rastlanan iki enzim, ürünün aromasının oluşumuna katkıda bulunan lipaz ve esteraz'dır. Bu enzimlerin aktivitesi nedeniyle, serbest yağ asitlerinin artmasının, çeşitli aromatik bileşiklerin oluşumu için bir öncü olduğu kabul edilir. Bu enzimlerin lipolitik aktivitesi, serbest yağ asitlerinin katabolizması ve uçucu bileşiklerin üretimi, sofralık zeytinlerin tat ve organoleptik profilleri sırasında olduğu gibi özellikle istenen bir özelliktir (Rodríguez-Gómez ve arkadaşları, 2012; Arroyo-López ve arkadaşları, 2012). 2017 verilerine göre, dünya sofralık zeytin üretimi 2.954.000-ton olarak gerçekleşmiştir. En önemli sofralık zeytin üreticisi olan ülkeler sırasıyla, AB, Mısır, Türkiye, Fas, Cezayir, Yunanistan ve Suriye'dir. Dünya sofralık zeytin üretiminde %20'lik paya sahip olan İspanya ilk sırada yer alırken, Türkiye üçüncü sıradadır. Siyah sofralık zeytin üretiminde ise ülkemiz birinci durumdadır.

Tablo 2.1. Sofralık Zeytin Üretimi (bin ton) (IOC, 2016)

	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	4 Yıllık Ortalama	Dünyadaki Üretim Payı (%)
İspanya	491.0	572.2	547.0	514.0	531	20.6
Mısır	453.0	400.0	400.0	400.0	413	16.0
Türkiye	410.0	430.0	410.0	397.0	412	15.9
Cezayir	175.0	208.0	233.5	234.0	213	8.2
Yunanistan	197.0	130.0	231.0	210.0	192	7.4
İtalya	76.0	69.3	42.0	50.0	59	2.3
Dünya	2.522.7	2.660.4	2.470.6	2.672.8	2.582	100

2.2. Zeytin Yapısı ve Bileşenleri

Zeytin meyvesinin şekli, rengi, boyutu çeşidine göre değişebilir ve besin içeriği bakımından oldukça değerlidir (Şekil 2.1.). Zeytin meyvesinde bulunan diğer önemli bileşikler pektin, organik asitler ve pigmentlerdir (Boskou, 1996). Zeytin meyvesinin yapısı incelendiğinde üç katmandan meydana geldiği görülür. Bunlar sırasıyla; epicarp (koruyucu yapı), mezokarp (etli kısım) ve endocarp (çekirdek) olarak sıralanır. Meyve ağırlığının ortalama %1-2'sini oluşturan epicarp yapısı, kabuk mumsu bir tabaka ile kaplıdır ve meyve için koruyucu özellik taşır. Meyve olgunlaşması ile kabuk rengi açık yeşilden mor veya kahverengi/siyah' a dönüşür. Sofralık zeytin üretiminde suyun iç kısma geçişini engellemektedir. Ayrıca meyveyi fiziksel hasarlardan ve böcek saldırılarından korumaktadır. Meyve eti yani mezokarp, zeytinin %70-80'inin oluşturur. Mezokarpın yapısında; lipid, şeker, protein, lif, fenolik bileşikler, organik asit, pektinli bileşikler ve diğer bileşikler bulunmaktadır (Bianchi, 2003). Son yapı olan endokarp, meyvenin %10-30'unu oluşturan ve hemiselüloz, selüloz, ligin içeren bir yapıdadır. Çekirdek çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengindir ve protein miktarı diğer katmanlara göre fazladır ve ilaç, kozmetik sanayi, plastik dolgusu, hayvan yemi ve reçine yapımında kullanılır. Çeşitli kullanım alanlarından dolayı zeytindeki bu yapı sadece gıda sanayisi için değil farklı sanayi kolları için de önemlidir (Rodriguez ve arkadaşları, 2007).



Şekil 2.1. Zeytin Tanesinin Yapısı (Boskou, 1996)

Zeytin meyvesinin büyümesi ve olgunlaşması, normal iklim koşullarında yaklaşık 5 ay süren uzun bir süreçtir. Ancak, bu durum iklim şekline göre değişir örneğin; soğuk iklim koşullarında, büyüme yavaşlar, olgunlaşma süresi uzar. Zeytin meyvesinde bulunan diğer önemli bileşikler pektin, organik asitler ve pigmentlerdir (Boskou, 1996). Organik asitler metabolik aktivite gösterir ve diğer bileşiklerin oluşumundan ve parçalanmasından kaynaklanan ara ürünlerdir (Cunha ve arkadaşları, 2001). Zeytin meyvesinin kimyasal bileşenlerinin dağılımı, yapısı karmaşıktır ve çeşitlilik, yetiştirme uygulamaları, coğrafi köken, olgunlaşma düzeyi gibi parametrelere bağlıdır.

Tablo 2.2. Zeytinin Ortalama Kimyasal Bileşimi (%) (Kritsakis, 1998)

SU	50-60
YAĞ	18-25
PROTEİN	1-3
ŞEKER	18
SELÜLOZ	5
MİNERAL MADDE(KÜL)	1.5
POLİFENOLLER	0.5-0.8
HİDROKARBONLAR	0.8-1
TOKOFEROLLER	0.3-0.8

2.3. Zeytindeki Fenolik Bileşikler

İkincil bitki metabolitleri olan fenolik bileşikler, meyve ve sebzelerde kimyasal yapılarına göre az veya çok miktarda bulunabilir (Bianco arkadaşları, 2000). Zeytin fenolleri, bitkinin farklı kısımlarına antimikrobiyal özellikler kazandırır ve meyvenin kahverengileşme derecesinden de sorumludur. Bu fenolik bileşenler ayrıca, zeytinin duysal ve aromatik özelliklerine katkıda bulunurken, farmasötik ve fizyolojik faydalar da sağlar (Bianchi, 2003; Covas ve arkadaşları, 2006). Meyvenin oksidatif stabilitesini sağlar. Oksidasyonu engelleyerek zeytinin de yağın da kötü tat kazanmasına engel olurlar. Bir çalışmada zeytinlerin, antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış ve bazı bakterilere karşı (*E. Coli*, *S. aureus*, *Lactococcus lactis* gibi) antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir (Rubia-Soria ve arkadaşları, 2006). Fenolik bileşikler, meyvenin doğal savunma sisteminin oluşturularak mikroorganizmalara ve böceklerle karşı dayanıklılığı arttırırlar (Siciancalepore ve arkadaşları, 1984).

Zeytin çeşitlerinde baskın olarak bulunan fenolik bileşikler farklılık gösterebilir. Siyah ve yeşil zeytinlerde genellikle baskın fenolik hidroksitirozol iken, Hojiblanca türü zeytinde yapılan bir çalışmada kafeik asitin yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir (Bianco ve arkadaşları, 2000).

Zeytin meyve etinde %1-3 oranında bulunan fenolik bileşikleri dört başlık altında sınıflandırabiliriz (Yorulmaz ve arkadaşları, 2008; Servili ve arkadaşları, 2002). Bunlar Tablo 2.3.'de verildiği gibi "fenolik asitler ve türevleri, fenolik alkoller, sekoiridoitler ve flavonoidler"dir.

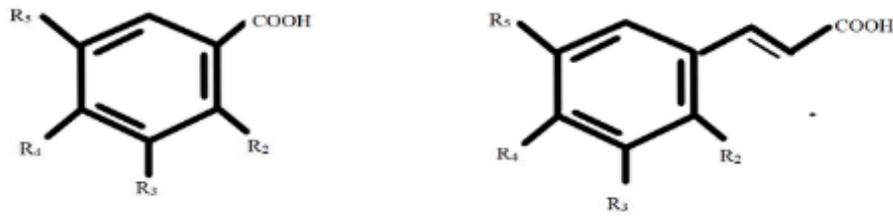
Tablo 2.3. Zeytinde bulunan fenolik bileşikler (Servili ve Montedoro, 2002)

Fenolik asitler ve türevleri	Fenolik alkoller	Sekoiridoit	Flavonoid
Vanilik asit	(3,4-dihidroksifenil) etanol (3,4-DHPEA)	3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA) ya bağlı elenolik asidin dialdehidik formu	Apigenin
Sirinjik asit	(<i>p</i> - dihidroksifenil) etanol (<i>p</i> -HPEA)	<i>p</i> -HPEA (<i>p</i> -HPEA-EDA) ya bağlı elenolik asidin dialdehidik formu	Luteolin
<i>p</i> -kumarik asit	(3,4- dihidroksifenil) etanol-glikosit	Oleuropein aglikon (3,4-DHPEA-EA)	Kuersetin
<i>o</i> -kumarik asit	(<i>p</i> - dihidroksifenil) etanol (<i>p</i> -HPEA)	Ligstrosit aglikon	
Gallik asit		Oleuropein	
Kafeik asit		<i>p</i> -HPEA-türevi	
Protokateşuik asit			
<i>p</i> -hidroksibenzoik asit			
Sinamik asit			
Benzoik asit			

2.3.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, sekonder aromatik bitki metabolitleri olarak adlandırılır (Andreasen ve arkadaşları, 2000; Prim ve arkadaşları, 2003). Fenolik asitler, hidroksisinamik ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki gruba ayrılır. Şekil 2.2.'de bu bileşiklerin önemli türevlerinin yapısal formülleri verilmiştir.

Fenolik asitlerin büyük bir kısmı bitkilerde organik asitler veya şekerler ile esterleşmiş halde bulunurlar. Hidroksisinamik asitin esterleri, glikozitleri ve amidleri birçok bitkide bulunmaktadır. Genellikle kafeik asit, ferulik asit, *o*-kumarik asit ve *p*-kumarik asit önem taşımaktadır. Hidroksibenzoik asitler ise meyvelerin yapısında genellikle az miktarda bulunur veya hiç bulunmayabilir. En önemli hidroksibenzoik asit türevleri gallik asit, vanilik asit, salisilik asit, *m*-hidroksibenzoik asit, *p*-hidroksibenzoik asit yer almaktadır (Sivakumar, 2005).

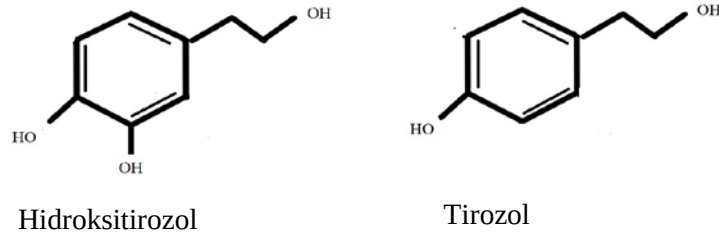


Benzoik asitler	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Sinnamik asitler
<i>p</i> -hidroksibenzoik	H	H	OH	H	<i>p</i> -kumarik asit
Protokateşik asit	H	OH	OH	H	Kafeik asit
Vanilik asit	H	OCH ₃	OH	H	Ferulik asit
Sinirjik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Sinapik asit
Gallik asit	H	OH	OH	OH	
Salisilik asit	OH	H	H	H	
Gensitik asit	OH	H	H	OH	

Şekil 2.2. Gıdalarda bulunan fenolik asitler

2.3.2. Fenolik Alkoller

Zeytin meyvesinde bulunan primer fenolik alkoller arasında, 3,4-dihidroksifeniletanol (hidroksitirozol veya h-tirozol), p-hidroksifeniletanol (tirozol) ve bunların glukozit formları bulunur (Ryan ve Robards, 1998). Zeytin meyvelerinde bulunan hidroksitirozol miktarları çok değişkendir, literatürde yer alan değerlerin çoğu yaklaşık 300 mg/kg ile 8000 mg/kg arasındadır (Esti ve arkadaşları, 1998; Romani ve arkadaşları, 1999). Yapılan bir çalışmada işlenmiş zeytinde hidroksitirozol seviyesi ~ 4 g/kg (kuru ağırlık) olduğu tespit edilmiştir (Pereira ve arkadaşları, 2006). Hidroksitirozol, oleuropeinin hidrolizinden üretilirken, ligstrosidinden de tirozol üretilir (Boskou ve arkadaşları, 2006). Hidroksitirozol ve tirozol, zeytinde sırasıyla en yüksek 76.73 ve 19.48 mg/100 g değerinde bulunmuştur (Kountouri ve arkadaşları, 2007).



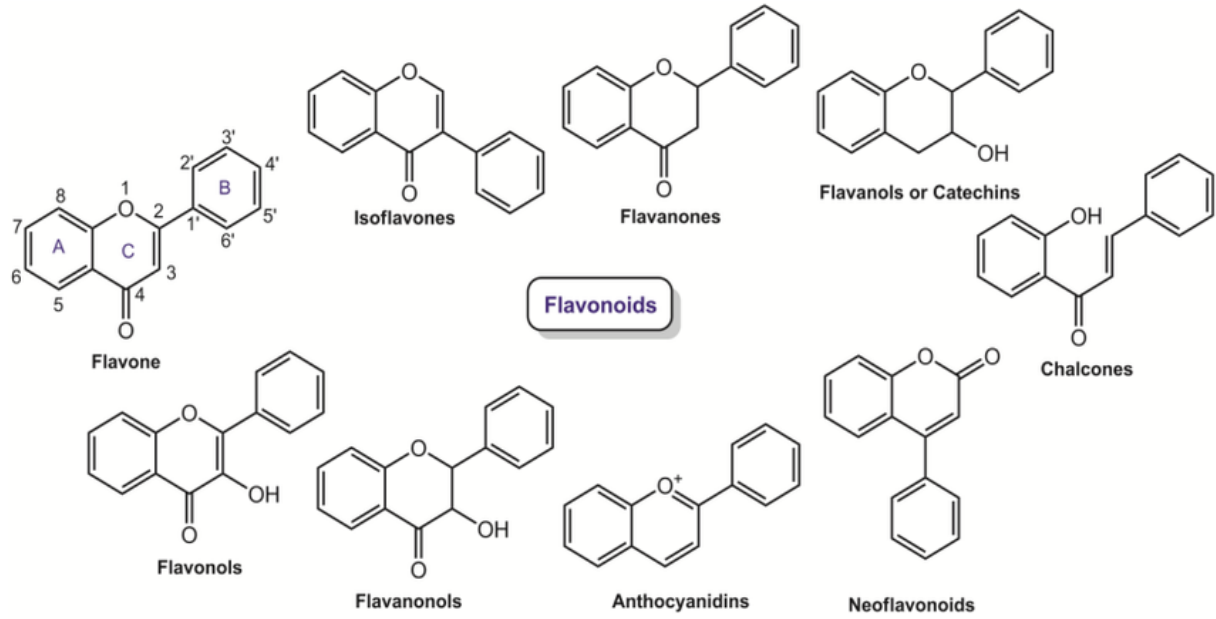
Şekil 2.3. Zeytinde bulunan başlıca fenolik alkoller

2.3.3. Flavonoidler

Flavonoidler, 1600'den fazla çeşitten oluşan insan diyetindeki en yaygın polifenolik bileşik grubudur. Tüm flavonoidler antioksidan aktiviteye sahip olmakla beraber bunlardan yaklaşık olarak 50 tanesi gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Meyve ve sebzelere çeşitli renkleri veren flavonoidlerin çoğu bitki pigmenti özelliği taşımaktadırlar (Naczka ve Shahidi, 2004).

Birçoğunun güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve kardiyovasküler ve kanser hastalığı riskini azaltabildiği bildirilmektedir (Knekt ve arkadaşları, 2002; Neuhouser, 2004).

Zeytinde, luteolin-7-glukozit, siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-rutinosid, rutin, apigenin-7-glukozit, kuersetin-3-rnazidin ve luteolin gibi flavonoidler en fazla bulunur (Soler-Rivas ve arkadaşları, 2000).

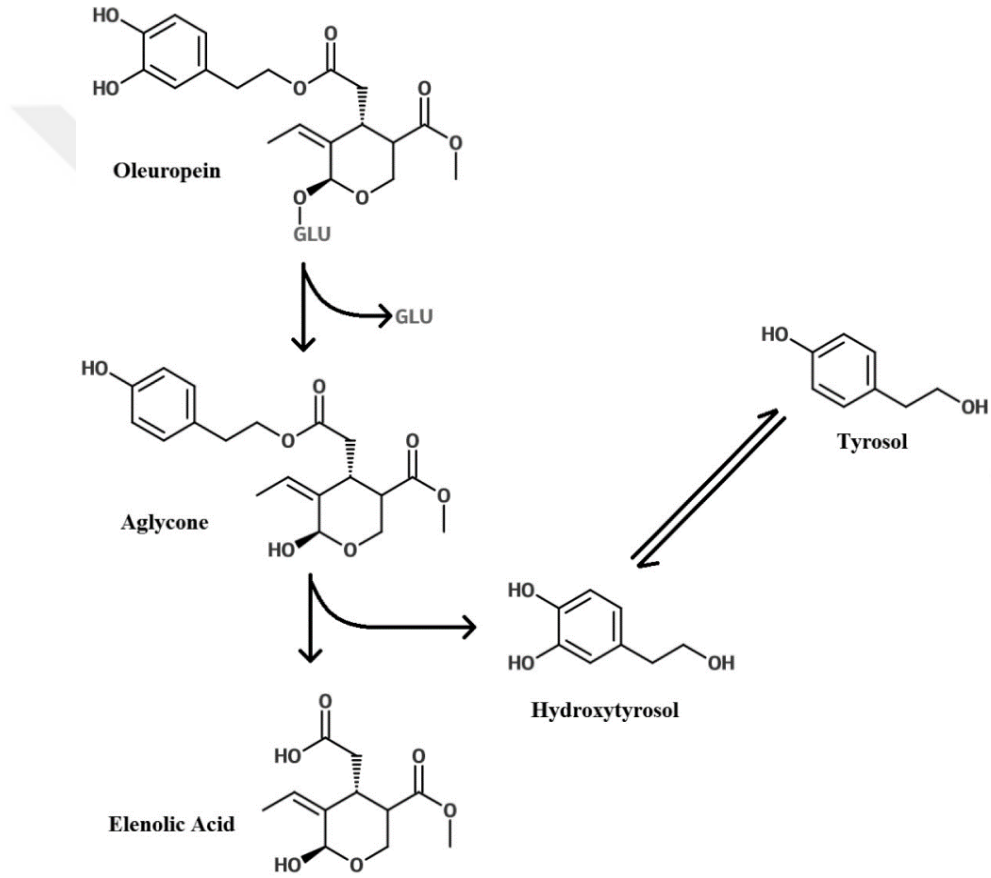


Şekil 2.4. Flavonoidlerin yapısı (Brenes ve arkadaşları, 1995).

2.3.4. Sekoiridoitler

Zeytinde fenolik bileşenler içerisinde en fazla bulunan grup sekoiridoitlerdir ve bunlardan baskın olanları; sekoiridoit glikozitler oleuropein ve ligstrosittir (Yorulmaz ve Tekin, 2008). Oleuropein, acı tadından sorumlu zeytin meyvesinin ana fenolik bileşiğidir ve üç farklı alt birimlerinden (hidroksitriosol, elenolik asit ve glikoz) oluşmaktadır (Şekil 2.5.). Meyve olgunlaşması sırasında, oleuropein miktarı azalırken; hidroksi tirozol, tirozol ve verbaskosid miktarı artar. Meyve karardığında (siyah renge dönüştüğünde) ise neredeyse tespit edilemez (Soler-Rivas ve arkadaşları, 2000; Yıldız ve Uylaşer, 2011). Sofralık zeytin işlemede, oleuropeinin kabul edilebilir bir seviyede parçalanması için, zeytin meyveleri, lye çözeltisi (NaOH) ile kimyasal işleminden geçirilmektedir veya pek çok LAB ve maya, β -glukosidaz üretimi ile sofralık zeytin işleme sırasında oleuropeini biyolojik olarak parçalama kabiliyetine

sahiptir (Arroyo-López, 2008). Sofralık zeytin fermentasyonu sırasında oleuropeinin suda rahatlıkla çözünebilmesi, meyvenin içerisinden sulu faza geçerek enzim ya da kimyasal kullanılmadan da miktarının azaldığı bilinmektedir (Yıldız ve Uylaşer, 2011). Zeytin meyvesinde bu kadar önemli biyoaktif bileşiklerin varlığı, bu türlerden üretilen başlıca ürünlerin, sofralık zeytinlerin ve saf zeytinyağının fonksiyonel gıda potansiyelini desteklemektedir. Genel olarak fenolik bileşikler ve özellikle de sekoiridoitler, zeytin meyvelerinin duysal özelliklerini etkiler ve sofralık zeytinlerin işlenmesi sırasında meydana gelen değişikliklerden büyük ölçüde sorumludur (Brenes ve arkadaşları, 1995).



Şekil 2.5. Oleuropeinin hidrolizinin kimyasal yapısı (Boss, 2016)

Klinik bir çalışmada, zeytin alımının plazmadaki polifenoller ve toplam antioksidan potansiyelini arttırdığı, böylece zeytin polifenollerinin, antioksidan etkilerine uygun olarak iyi biyoyararlanıma sahip olduklarını göstermiştir (Kountori ve arkadaşları, 2007). Fenolik bileşikler, büyüme periyodunda niteliksel ve niceliksel olarak değişir. Zeytin meyvelerinde yeşil ve siyah meyvelere karşılık gelen iki olgunlaşma aşaması vardır. Yeşil olgunlaşma

aşamasında, zeytin meyveleri nihai boyutlarına ulaşır ve renkleri sarı yeşildir. Daha sonra, ciltteki yeşil renklendirici pigmentler (yani klorofiller) yerine “benekli” “mor” ve “siyah” bir aşamaya geçişi sağlayan antosiyaninler yerleştirilir. Sarı-yeşil ve mor-siyah arasındaki aşamada, zeytinler en yüksek miktarda fenolik bileşiğe, özellikle oleuropeine sahiptir.

Ham zeytinlerde bulunan fenolik bileşikler, 3,4-dihidroksifenilglukol, antosiyaninler, flavonoidler ve fenolik asitlerdir (Bianchi ve Pozzi, 1994). Fenolik bileşikler içerisinde en bol bulunan, antosiyaninler siyanidin 3-O-glukozit ve siyanidin 3-O-rutinosid'dir. Düzeylerinin sırasıyla 50 ila 880 mg/kg ve 250 ila 3200 mg/kg arasında değiştiği bulunmuştur (Romani ve arkadaşları, 1999). Quercetin 3-O-glukozit (rutin) ve luteolin 7-O-glukozit, ham zeytin meyvelerinde bulunan iki ana flavonoidlerdir (Amiot ve arkadaşları, 1986; Vlahov, 1992). Sırasıyla 110 ila 660 mg/kg ve 5 ila 600 mg/kg arasında değişen seviyelerde bulunurlar (Panizzi ve Scarpatti, 1960; Esti ve Cinquanta, 1998). Fenolik bileşiklerden özellikle oleuropein ve bazı zeytinlerde bulunan ligitrosit miktarları yeşil olgunlaşma fazının başlamasıyla esteraz enzimi aktivitesi sonucu hidrolize uğrayarak azalır. Oleuropein konsantrasyonunun azaltılması, dimetiloleuropein ve elenolik asit glikozid olmak üzere iki bileşiğin oluşmasıyla aynı zamanda meydana gelir (Ryan ve arkadaşları, 1999). Olgunlaşmamış meyve özünün, hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklarda etkinliğinden sorumlu olduğu düşünülen kalsiyum kanal bloker aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Gilani ve arkadaşları, 2005). Benzer şekilde, zeytin meyvesinin ekstraktının kolinerjik ve kalsiyum kanal bloker bileşenlerinin varlığına aracılık eden antidiarreal aktivitelerin bir kombinasyonunu içerdiği gösterilmiştir (Gilani ve Khan, 2009). (Cimato ve arkadaşları, 1990), meyve olgunlaşmasıyla birlikte "daha yüksek moleküler ağırlıklı" bileşenlerin hidrolizinin meydana geldiğini ve bunun tirozol ve hidroksitirozol oluşumunu sağladığını göstermiştir. Zeytin ürünlerinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan araştırmalar, zeytin yaprakları, zeytin meyveleri, oleuropein ve hidroksitirozol gibi saf bileşikler ile gerçekleştirilmiştir (Markin ve arkadaşları, 2003). Hidroksitirozol ve oleuropeinin; *Haemophilus influenza*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakteri ve mikrofungusların büyüme oranını inhibe ettiği veya geciktirdiği gösterilmiştir (Uccella, 2001). Oleuropein, vanillik ve p-kumarik asitler ayrıca, in vitro çalışmalarda *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Bacillus cereus* gibi bazı bakterilerin büyümesini de engelleyebileceği ve 6 mg/mL oleuropein varlığında aflatoksin üretimi büyük ölçüde azaltılabileceği bulunmuştur (Gourama ve Bullerman, 1987). Yapılan bir çalışmada oleuropeinin nöroprotektif özelliğini araştırılmıştır ve Parkinson, Alzheimer hastalıklarıyla

ilgili sinirlerin zarar görmesini engellediği görülmüş ve tedavi edici etkilerinin olduğu bu hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür (Barbaro ve arkadaşları, 2014). Antioksidanlar oksidasyonu geciktiren veya engelleyen bileşiklerdir. Düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL), kolesterolünün okside olmasıyla atardamar yapılarına zarar verebileceği için kolesterolün en tehlikeli formu olarak bilinir.

Oleuropeinin, LDL kolesterolünün oksidasyonunu azaltmaya yardımcı olduğu belirtilmektedir (Durlu-Özkaya ve Özkaya, 2011). Kanseri, yaşlanma, iltihaplanma gibi farklı hastalıklara sebebin oksidatif stres olduğu düşünülmektedir (Huang ve Sumpio, 2008). Günümüzde insanlarda yaygın olarak oksidatif hasar riski olduğu kabul edilmektedir. Bitki bazlı antioksidanların alımı ile bu hasar azaltılabilir. Serbest radikal temizleyicileri olan zeytin polifenoller, kırıksıklıklar ve cilt kuruluğu gibi diğer rahatsızlıkların oluşumuyla bağlantılı oksidatif hasarı önleyerek cilt sağlığına olumlu katkıda bulunur (Saari ve arkadaşları, 2012). Dahası, çalışmalar fermente sofralık zeytinlerin mikrobiyosunun spesifik probiyotik özellikler gösterdiğini ve dolayısıyla zeytinlerin konakçıya probiyotik vermek için aynı zamanda laktoz ve kolesterol içermeyen iyi matrisler olarak kabul edildiğini göstermiştir (Ramos, 2013). Sofralık zeytinlerin fenolik fraksiyonu çok karmaşıktır ve zeytinin çeşidine göre, işleme metoduna bağlı olarak fenolik bileşiklerin niteliği ve miktarında değişiklik gösterebilir (Romani ve Mulinacci, 1999; Romero ve arkadaşları, 2004).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Metanol (HPLC grade), formik asit, sodyum karbonat ve hidroklorik asit Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından; fenol bileşikleri, aroma maddeleri, organik asit ve şeker standartları Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sülfonik asit) ve Trolox ((+/-)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asit) Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, ABD) firmasından ve etanol Riedel de Haen Co. (Seelze, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Ellajik asit ve potasyum persülfat Fluka firmasından temin edilmiştir. HPLC’de mobil fazların hazırlanmasında deiyonize su kullanılmıştır. Standart çözeltiler ve diğer hassas çözeltiler analizler öncesi günlük olarak hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada materyal olarak 2018 yılı Gemlik tipi yeşil zeytin kullanılmıştır. Zeytin örnekleri eylül ayında Adana yöresinden hasat edilmiştir. Üretimler 2’şer tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Sofralık zeytin üretiminde ülkemizde kırma ve çizme yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmada taze zeytinin sofralık zeytine işleme yöntemlerinden ‘kırma yöntemi’ tercih edilmiştir. Kırma yöntemi, zeytinler yeşil renkteki olgunlaşmış tanenin tabii yapısı bozulmadan kırılarak salamura su ile acılığının giderilmesi işlemidir (Şekil 3.1.). Taze zeytin örnekleri tane yapısını bozmadan kırma işlemi sonrasında %2’lik tuzlu su içerisine alınmıştır. Kullanılan tuzlu su çözeltisi 2-3 gün sonra değiştirilmiştir. Bu sayede zeytinin acılığı giderilmiştir ve zeytinler %8’lik salamura suyuna konularak, olgunlaşma aşamasına kadar (30 gün boyunca) 25 °C oda sıcaklığında laboratuvar ortamında bekletilmiştir. Fermantasyon tamamlandıktan sonra örneklerin çekirdekleri çıkartılarak dondurularak kurutucuda dondurulmuş ve -18 °C’de saklanmıştır. Dondurarak kurutma işlemiyle, hesaplamalarda kuru maddeye bağlı farklılıkların giderilmesi sağlanmıştır. Yapılacak analizler öncesinde saklanan örnekler öğütülerek kullanılmıştır.



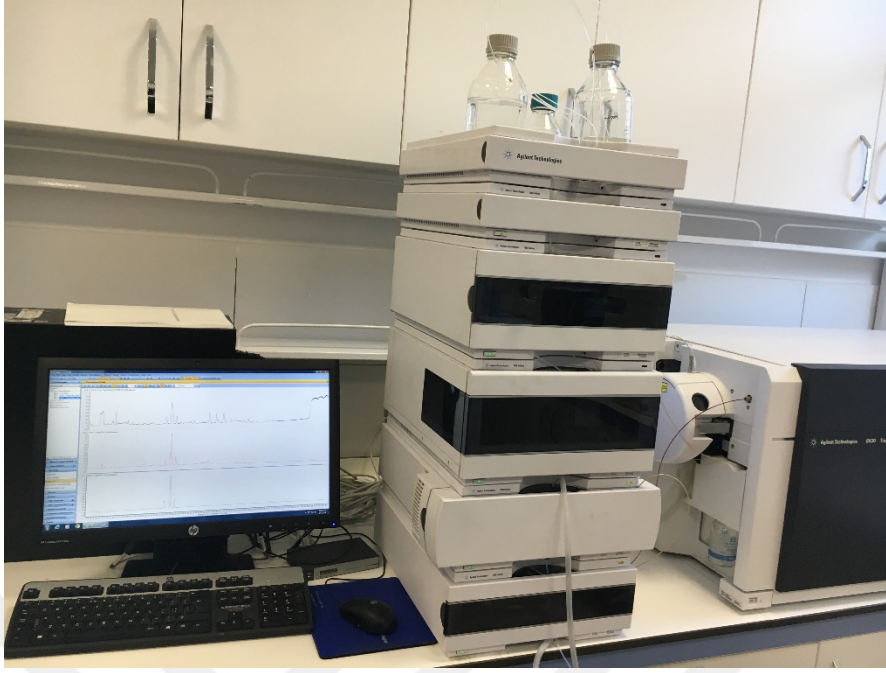
Şekil 3.1. Kırma yöntemi ile sofralık zeytin üretim aşamaları



Şekil 3.2. Sofralık zeytin

3.2.1. Fenolik bileşiklerin analizi

Zeytinde bulunan fenolik bileşiklerin tanımlanmasında Agilent 6430 Triple Quadrupole kütle spektroskopisi (Agilent Technologies. Palo Alto CA-USA) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (LC-DAD-ESI-MS/MS) kullanılmıştır (Şekil 3.3). 2 gram zeytin blender yardımı ile parçalandıktan sonra üzerine 20 ml metanol+ su (85/15) karışımı ilave edilerek 60 dakika karıştırıldı. Daha sonra örnekler 7000 rpm’de 4°C ‘de 15 dakika santrifüj edildikten sonra döner evaporatörde konsantre edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar (Şekil 3.5.) 0.45 µm’lik membran filtrelerden geçirilerek HPLC’ye enjekte edilmiştir. Analizler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Analizlerde kullanılan HPLC-ESI-DAD-MS/MS

Analizlerde kullanılan HPLC koşulları şu şekildedir:

Kolon: C18 ODS (25×4.6 mm×5 µ)

Enjeksiyon miktarı: 20 µL

Taşıyıcı faz: A=Su/formik asit (95:5. h/h). B= Su / Solvent A (40/60. h/h)

Akış hızı: 1 ml/dak

Dalga boyu: 280. 320. 360 nm

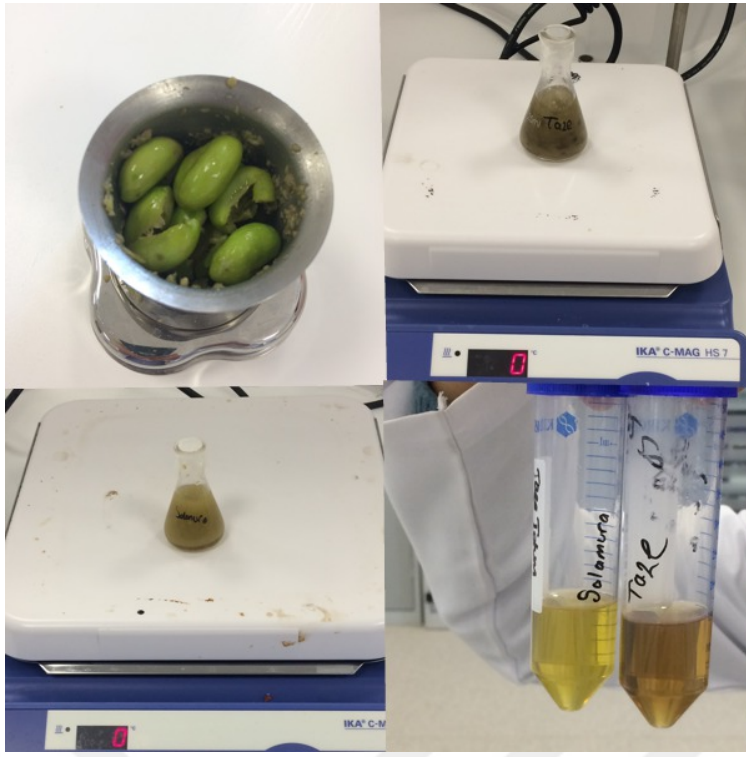
Dedektör tipi: Diyot array dedektör

HPLC analizlerinde kullanılan elüsyon sistemi şu şekildedir:

Süre (Dakika)	% A	% B
0	95	5
10	85	15
15	80	20
25	80	20
45	60	40
55	40	60
70	30	70
71	0	100
79	0	100
80	95	5
82	95	5

Şekil 3.4. Fenolik bileşiklerinin HPLC analizlerinde kullanılan elüsyon sistemi

Fenolik bileşiklerin tanısı, kullanılan standart maddelerin alıkonma zamanları ve spektrumlarından. literatür verilerinden ve LC-DAD-MS/MS cihazından yararlanılarak yapıldı. Zeytin analizinde kullanılacak her bir standart madde için beş farklı konsantrasyonda çözelti hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edilerek her bir bileşik için kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Bu eğrilerden de bileşiklerin miktarları hesaplandı. LC-DAD-MS/MS analizleri elektrosprey kütle spektrometrisi kullanılarak pozitif ve negatif mod olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. LC-MS/MS'de zeytinler fenolik bileşik analizlerinde sıcaklık 400 °C, kapillar voltaj -3V, nebulizatör gaz akışı 1.75 L/dakika, çözünme gaz akışı 1 L/dakika ve sprej voltaj 5 kV olarak seçilmiştir.



Şekil 3.5. Zeytinlerde fenolik bileşiklerin ekstraksiyon işlemi

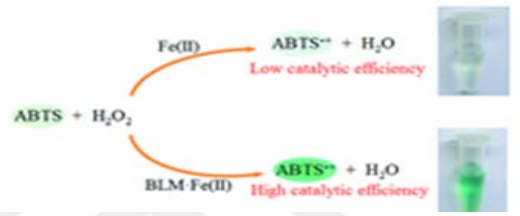
3.2.2. Antioksidan kapasitenin belirlenmesi

Taze ve fermente zeytinlerde antioksidan aktiviteleri DPPH ve ABTS yöntemleriyle belirlenmiştir (Şekil 3.6.). DPPH yönteminde, serbest radikalleri önleme yeteneğini ölçebilen DPPH (2,2, difenil 1-pikri hidrazil) kullanılmıştır. Bu yöntem için 2,36 mg DPPH 100 mL metanol ile karıştırılarak, yarım saat ultrasonik banyoda tutuldu. Daha sonra elde edilen ekstraktan 20 µL zeytin alınarak 2.98 mL hazırlanan tampon karıştırılmış, 30 dakika sonra metanol içerisinde gerçekleşen reaksiyonun zamana karşı değişimi 515 nm’de UV-Vis (Agilent –Cary 60) spektrofotometresi kullanılarak belirlenmiştir.

DPPH



ABTS



Şekil 3.6. DPPH ve ABTS yöntemleriyle antioksidan kapasite analizleri

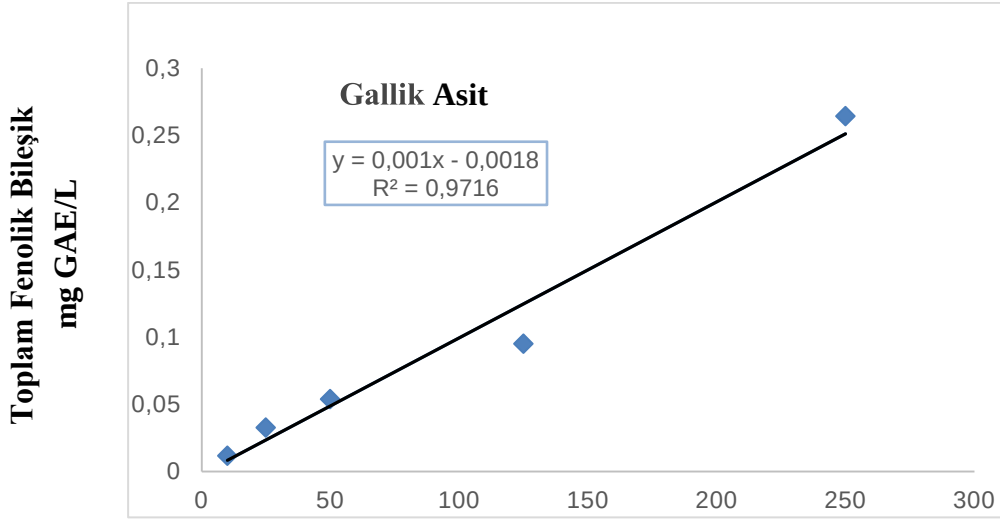
ABTS yöntemi için 7 mM ABTS (2,2'-Azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic asit) 2.45 mM potasyumbisülfat ile karıştırılarak karanlık ortamda 12-16 saat bekletilmiş ve daha sonra bu karışım sodyum asetat (pH 4.5) tamponu ile spektrofotometrede 734 nm dalga boyunda 0.700 ± 0.01 absorbans olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra 20 μ L zeytin ekstraktına 2.98 mL hazırlanan tampon karıştırılarak, 10 dakika sonra spektrofotometrede 734 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri Trolox (10–100 mM/L) standart eğim çizelgesi ile hesaplanarak sonuçlar mM Trolox/kg cinsinden ifade edilmiştir. Analizler Agilent Carry-60 marka UV-Vis spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7. Analizlerde kullanılan UV-Vis spektrofotometre (AgilentCarry 60)

3.2.3. Toplam Fenolik Madde Analizi

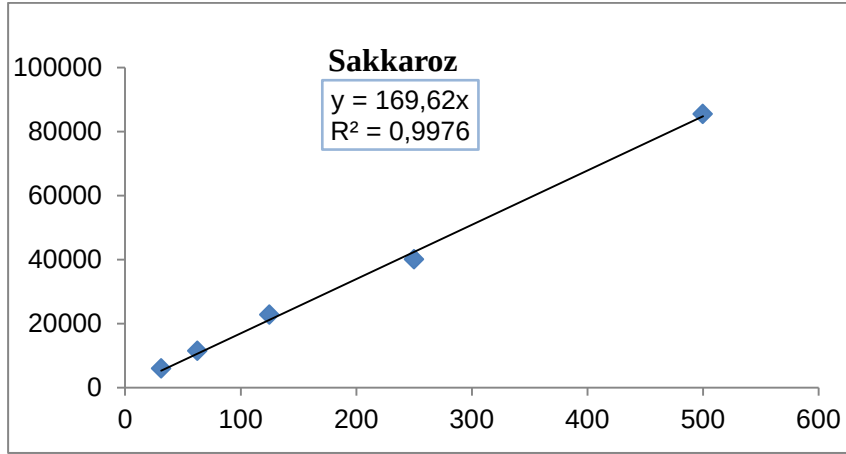
Toplam fenolik madde analizi, Saafi ve arkadaşları, (2009)'nın uyguladıkları yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesinde örnekler seyreltildi ve seyreltilen örneklerden 200 µl alınarak üzerine 1.5 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi (1/10 oranında saf su ile seyreltilmiş) ilave edilerek 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bu karışıma %20'lik sodyum bikarbonat ilave edilmiştir ve 90 dakika bekleme sonrası UV spektrofotometre (AgilentCarry 60) ile 750 nm'de absorbans değerleri okundu. Toplam fenolikler, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (5,10, 25, 50, 100, 250, 500 ppm) gallik asit standartlarının aynı yöntemle belirlenen absorbanslarından elde edilen kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır. Hesaplama da kullanılan gallik asidin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.8. 'de verilmiştir.



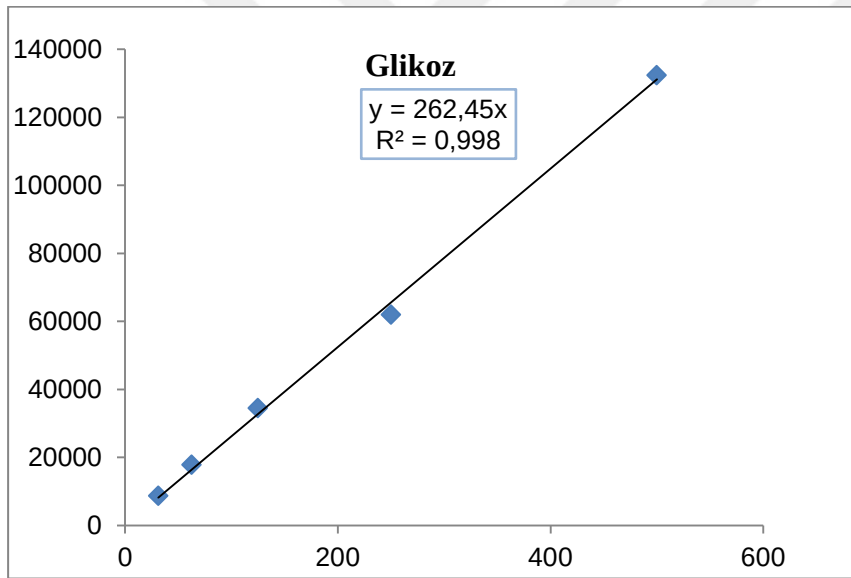
Şekil 3.8. Toplam Fenolik Bileşik Analizinde Kullanılan Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi

3.2.4. Şeker Analizi

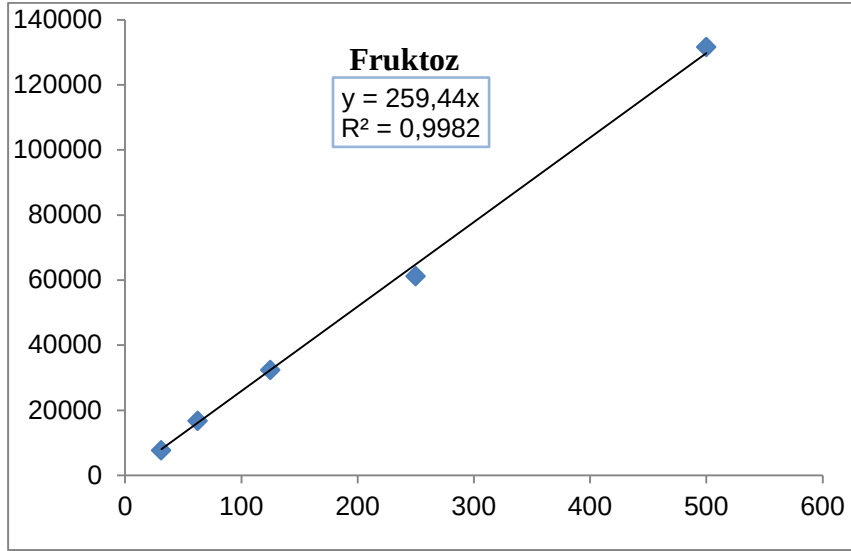
Sofralık zeytindeki şeker miktarını belirlemeye yönelik analizler, Legua ve arkadaşları, (2012)'nin metodunda bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler Agilent 1260 UV ve RID dedektörlü HPLC'ye enjekte edilerek örneklerdeki şeker miktarları belirlenmiştir. Taşıyıcı faz olarak 5 mM'lık sülfürik asit çözeltisi kullanılmıştır ve akış hızı 0.6 ml/dakika olarak ayarlanmıştır. Şeker konsantrasyonlarının belirlenmesinde dış standart yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla glikoz ve fruktoz standartlarından 5 farklı konsantrasyonda kalibrasyon çözeltileri hazırlanıp. HPLC analizleri yapıldı ve elde edilen verilerden kalibrasyon eğrileri oluşturulup ve bu eğriler kullanılarak, zeytin ekstraktlarındaki şeker miktarları belirlenmiştir.



Şekil 3.9. Sakkaroz için kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.10. Glikoz için kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.11. Fruktoz için kalibrasyon eğrisi

3.2.5. Zeytinlerde genel bileşim analizleri

Zeytinde renk bileşim, asitlik, pH ve kuru madde analizleri yapılmıştır (Ekşi ve Artık, 1986; Ekşi ve Özhamamcı, 2009).

Renk bileşim tayini

Renk ölçümlerinde, (Uzuner ve arkadaşları, 2011)'in belirttiği yöntemle Hunter Lab Scan (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA, USA) cihazı kullanılarak L^* , a^* , b^* değerleri kaydedilmiştir. ' L^* ' değeri parlaklığı (beyazlık veya açıklık koyuluk); '+ a^* ' değeri kırmızı; '- a^* ' değeri yeşil; '+ b^* ' değeri sarı ve '- b^* ' değeri mavi renkleri temsil etmektedir. Bu değerlere bağlı olarak aşağıdaki formüllere göre renk berraklığı (Chroma) ve renk tonu (Hue) değerleri de hesaplanmıştır.

$$\text{Renk berraklığı} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$\text{Renk tonu} = \text{Arctan} (b^*/a^*)$$



Şekil 3.12. Zeytinlerde renk bileşim analizi

Tuz tayini

10 mL zeytin salamuraşı nötrale edildikten sonra 100 mL'ye tamamlandı ve buradan 25 mL alınarak %5'lik $K_2Cr_2O_7$ indikatörü eşliğinde 0.1 N $AgNO_3$ ile titre edilerek elde edilen sarfiyattan % tuz miktarı hesaplanmıştır (Anonim 2003).



Şekil 3.13. Zeytinlerde tuz tayini işlemi

3.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Zeytin örneklerinin analiz sonuçları SPSS 18 paket programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş ve Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, önemli bulunan farklılıklar incelenmiştir. Ayrıca, XLSTAT 2015 paket programı kullanılarak verilere temel bileşen analizleri uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Taze ve Fermente Zeytinin Genel Bileşimleri

Taze ve fermente zeytinde yapılan renk, toplam asitlik, pH, tuz, toplam fenolik madde, antioksidan kapasite, şeker bileşimi analizleri yapılmıştır ve sonuçlar Tablo 4.1’ de verilmiştir.

Taze ve Fermente Zeytinlerin Renk Özellikleri:

Zeytinin yüzeyinin rengi kalitesinin göstergesi olarak kabul edilir. bu nedenle zeytin fermantasyona bırakıldığında yaygın olarak renk değişimleri izlenir. Proses sonrası oluşan bu değişimleri Kolorimetre cihazı ile ölçülmesi sonucu elde edilen L^* , a^* , b^* , c^* ve h (hue) değerlerinden yararlanılmıştır. ‘ L^* ’ değeri parlaklığı (beyazlık veya açıklık koyuluk); ‘ $+a^*$ ’ değeri kırmızı; ‘ $-a^*$ ’ değeri yeşil; ‘ $+b^*$ ’ değeri sarı ve ‘ $-b^*$ ’ değeri mavi renkleri, c^* (Chroma) değeri renk berraklığını, h (hue) değeri ise renk tonunu temsil etmektedir. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi taze zeytinde L değeri 41.14 ile 44.93, a^* değeri 0.52 ile 3.37, b^* değeri 8.53 ile 17.98, c^* değeri 8.54 ile 18.29 ve h değeri ise 86.50 ile 79.37 arasında bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, zeytin fermantasyonu sonucunda parlaklığının, yeşil renginin ve berraklığının arttığı tespit edilmiştir. Bu parametre fermantasyonun etkisiyle, muhtemelen klorofiller ve karotenoid pigmentlerin dönüşümü ve polifenol bileşiklerinin oksidasyonu nedeniyle değişmiştir. López-lópez ve arkadaşları, (2007), taze ve salamura zeytinde L değerini 61.70 ile 50.86, a değerini 9.56 ile 5.44, b değerini 37.54 ile 38.81 ve c değerini 39.05 ile 39.24 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Zeytinin fermantasyonu sonrasında L ve a değerlerinde azalma meydana gelmiş, b ve c değerlerinde ise artış söz konusudur. Bu sonuçlar bizim elde ettiğimiz verilerden farklı bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada meyvenin fermantasyonu ile birlikte renk değerlerimizde olumlu bir artış gözlemlenmiştir. Bu farklılığın nedeni zeytinin çeşidi, yetiştiği bölge, hasat zaman farklılığından ötürü olabileceği tahmin edilmektedir.

Toplam Asitlik (%) ve pH değışimleri:

Sofralık zeytinde baskın olarak bulunan asit laktik asittir. Fermantasyon sırasında ortaya çıkan laktik asitler, zeytinde bulunan asitlik ve pH değeri ile ilişkilidir ve bu iki kriter sofralık zeytinin organoleptik kalitesi açısından oldukça önemlidir. Analizi yapılan zeytin örneklerinde pH değeri 5.85 ile 5.6 olarak tespit edilmiştir. Toplam asitlik laktik asit cinsinden yüzde 0.09 ile 0.10 olarak bulunmuştur. Fermantasyon sırasında ortamda var olan şekerler laktik asit bakterileri sayesinde organik asitlere dönüşür ve ortamdaki asitlik artar, pH değeri azalma meydana gelir. Irmak ve arkadaşları (2010), işleme tekniklerine göre farklı çeşit zeytinlerde yapmış olduğu bir çalışmada pH değerlerini incelemiştir. Memecik çeşidi zeytin taze halde pH değeri 5.57 ± 0.01 olarak bulmuş, bu zeytine oksidasyon işleme tekniği uygulandıktan sonra pH değerinin 3.38 ± 0.02 ye düştüğü ancak Gemlik çeşidi zeytin taze haldeyken pH değeri 5.68 ± 0.03 iken doğal fermantasyon sonrasında pH değerinde artış gözlenmiş ve 5.82 ± 0.02 olarak bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada organik ve konvaksiyonel olarak yetiştiren Memecik zeytini sofralık zeytin olarak işlenmiş ve kıyaslaması yapılmıştır. Toplam asitlik ve pH'ları önemli derece farklı bulunmuştur. Organik olarak yetiştirilen zeytinin titrasyon asitliği 0.47 ± 0.01 g/L, konvaksiyonel olanı ise 0.37 ± 0.01 g/L ve pH'ları sırasıyla 5.02 ± 0.01 , 5.23 ± 0.01 olarak tespit edilmiştir (Pazır ve Küçükyasar, 2019). Zeytin ve arkadaşları, (2008), Domat çeşidi zeytin NaOH ile muamele sonrası fermantasyona bırakılması sonucunda pH değeri 5.92 ± 0.01 ile 5.80 ± 0.01 olarak azalma gösterirken, asitlik miktarı 0.11 ± 0.01 g/L'den 0.21 ± 0.01 g/L'ye yükselmiştir. Bu değer elde edilen değerler ile benzerlik göstermektedir.

Tuz Miktarındaki Değişim:

Örneklerin tuz miktarları %0.37- %5.79 arasında değişmiş, zeytinleri işleme tekniğimizden dolayı fermente zeytinde tuz miktarı artış gözlemiştir. Bulduğumuz değerler 2014/33 TSE Sofralık Zeytin Tebliğine uygundur. Özay ve arkadaşları, (1994) ülkemizdeki zeytinlerin geleneksel yöntemlerle fermente edilmesi sonucunda tuz oranının %10 'un üstünde olduğunu belirtmişlerdir. Tuz konsantrasyonu fermantasyona yardımcı olan mikroorganizmaların ve son ürün özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır. Ancak, 2014/33 TSE Sofralık Zeytin

Tebliğine göre son ürünlerdeki tuz oranı maksimum %8 değerinde olmalıdır. Randazzo ve arkadaşları, (2019) yapmış oldukları bir çalışmada salamura ile işlenen zeytinlerdeki tuz miktarını %5 olarak bulmuştur. Irmak ve arkadaşları, (2010), farklı işleme teknikleri ve çeşit zeytinlerde tuz miktarını, Fermente yeşil Domat zeytinde %8.64, oksidasyon ile karartılan Memecik siyah zeytinde %8.11, doğal fermente çizme Domat zeytin çeşidinde %7.18, doğal fermente siyah zeytinin Uslu çeşidinde %11.18 ve doğal fermente çevirme siyah Gemlik zeytinde %5.42 olarak bulmuşlardır.

Toplam Fenolik Madde Miktarındaki Değişim:

Toplam fenolik madde zeytinde 9.23-10.73 mg/g arasında değişmiştir. Fermentasyon işlemine bağlı olarak toplam fenolik madde miktarında önemli bir azalış meydana gelmiştir. (Pazır ve Küçükyaşar, 2019), yapmış oldukları çalışmada sofralık zeytinin toplam fenolik madde içeriğini 0.81 ± 0.49 - 0.82 ± 0.57 mg/g arasında bulmuşlardır ($p < 0.05$). Pirgun'un 2007 yılında yaptığı çalışmada Gemlik ile Halhalı çeşidi zeytinlerin olgunluk başı-sonu arasındaki farklılıkları araştırılmıştır. Gemlik çeşidi için toplam fenolik madde içeriği 2.06-2.78 mg/kg (CAE), Halhalı zeytin içinse 2.88-3.14 mg/kg (CAE) olarak tespit edilmiştir. İki çeşit zeytinde de meyvenin olgunlaşmasıyla beraber toplam fenolik içeriğinde artış gözlenmiştir ($p < 0.05$). Çalışmamızda elde edilen veriler bu çalışmalarda verilerle benzer ancak daha yüksek değerlerde bulunmuştur.

Antioksidan Kapasite Potansiyellerindeki Değişim:

Zeytinlerde antioksidan aktiviteleri DPPH ve ABTS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Tablo 4.1.'de zeytinlerin antioksidan kapasite sonucundan elde edilen veriler verilmiştir. DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite 10.34-10.74 μ mol Trolox/kg olarak saptanmıştır. ABTS yönteminde ise bu değer 9.30-9.67 μ mol Trolox/kg olarak saptanmıştır. Yapılan iki yöntemde de fermente zeytin, taze zeytine göre daha düşük değerlerde bulunmuştur. Cano-Lamdrıd ve arkadaşları, (2016) farklı sulama tekniklerinin sofralık zeytin üzerine etkilerini inceledikleri bir çalışmada antioksidan kapasitesini belirlemek için ABTS ve DPPH yöntemlerini kullanmışlardır. ABTS, 13.2-13.4 mmol Trolox/kg aralığında, DPPH, 13.1-13.6 mmol Trolox/kg arasında bulmuşlardır ($p < 0.05$). Her iki yöntemde de antioksidan kapasitesi yüksek olarak fermente zeytin bulunmuştur ve bu çalışma yaptığımız analiz sonucu ile benzerlik göstermiştir. Özdemir ve arkadaşları, (2015), Ankara ilinde yetiştirilmiş Gemlik

çeşidi zeytinde DPPH yöntemini kullanarak antioksidan aktivitesini 8.24 ± 6.48 μmol Trolox/kg olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız Gemlik çeşidi zeytinin antioksidan aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Zeytinde bulunan antioksidan aktivitesi meyvenin yetiştirildiği bölge ve iklim şartlarından önemli ölçüde etkilendiği sonucuna varılmıştır.

Şeker Miktarındaki Değişim:

Tablo 4.1’de belirtildiği gibi zeytin örneklerindeki şeker bileşenleri; sakkaroz, glikoz ve fruktoz olarak belirlenmiştir. Bu şekerlerin toplam miktarı 3.03-5.80 g/L arasında değişmiş ve fermentasyona uğrayan zeytinlerin şeker miktarının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu azalmanın nedeni olarak laktik asit bakterileri gösterilebilir. LAB ortamda bulunan şekeri fermentasyon sırasında kullanarak şeker miktarlarını düşürmüşlerdir. Bu durum çoğu fermente gıda ve turşu üretiminde asitliğin artmasına bağlı olarak tat ve kalitenin artması için kullanılan bir uygulamadır. Miktarları belirlenen şekerler içerisinde genel olarak glikoz baskın olan şeker olarak saptanmış ve bunu sırasıyla fruktoz ve sakkaroz izlemiştir. Çalışmamızdaki şeker dağılımına bakıldığında sakkaroz miktarı 0.61-0.18 g/L, glikoz miktarı 2.89-1.42 g/L, fruktoz miktarı ise 2.30-1.43 g/L olarak bulunmuştur. Lopez-Lopez ve arkadaşlarının (2007), Manzanilla çeşidi salamura yeşil zeytinde yapmış oldukları çalışmada glikoz, fruktoz ve diğer çalışmalardan farklı olarak mannitol belirlemişlerdir. Sırası ile taze zeytin ve salamuraadaki glikoz miktarı 1.13-0.36 g/L, fruktoz mikarı 4.10-0.51 g/L ve mannitol miktarı ise 1.76-4.80 g/L olarak belirtilmiştir. Kiai ve Hafidi’nin 2014 yılında yaptıkları çalışmada 3 farklı çeşit zeytinde salamura sonrası toplam şeker içerikleri incelenmiş ve Sevilana tipi yeşil zeytinde şeker içeriği, 12.6 g/L’den 2.6 g/L ye düşmüş, Ascolana tipi yeşil zeytinde, 10.7 g/L’den 2.6 g/L ye, Moraccon tipi yeşil zeytinde ise 6.7 g/L’den 1.4 g/L ye düşmüştür. Yapılan bir çalışmada Gemlik tipi yeşil zeytin şeker miktarı 3.16-2.7 g/L aralığında bulmuşlardır (Kadalkal, 2009). Yapılan başka bir çalışmada ise salamura zeytindeki toplam şeker miktarı 3.18- 2.81 g/L olarak tespit edilmiştir (Özdemir, 2011). Çalışmamızda kullanılan taze zeytinin şeker miktarı diğer çalışmalara göre düşük çıkmıştır ancak fermentasyon sonrası şeker miktarları Özdemir ve Kadalkal ile benzerlik göstermiş, Hafidi ve Kiai’nin sonuçlarından daha yüksek bulunmuştur. Zeytinlerdeki şeker içeriği zeytinin türüne ve uygulanan prosese göre değiştiği belirlenmiştir. Zeytin meyvesinde hem olgunlaşma hem de işlenme sırasında bir dizi dönüşüm meydana gelir. Şekerler, metabolik değişiklikler için enerji sağlar ve zeytinde önemli bir rol oynarlar. Salamura zeytinlerde fermentasyon sırasında gerçekleşen laktik asit bakterileri metabolizması nedeniyle şeker içeriğinde azalma olmaktadır.

Tablo 4.1. Taze ve Fermente Zeytin genel bileşimleri

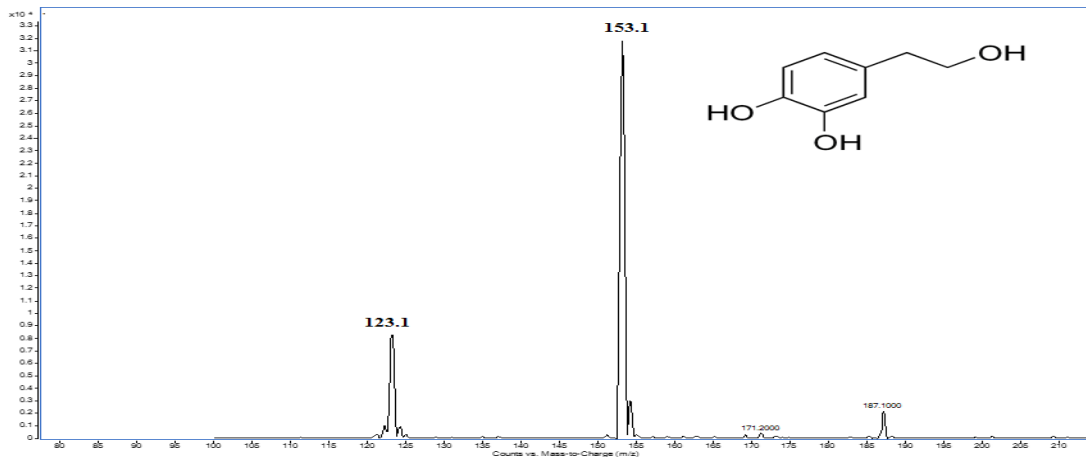
Analizler	Taze Zeytin	Fermente Zeytin	P değeri
L	41.14±0.21	44.93±0.03	*
a*	0.52±0.02	3.37±0.01	*
b*	8.53±0.24	17.98±0.01	*
C	8.54±0.24	18.29±0.01	*
H	86.50±0.17	79.37±0.03	*
Toplam fenolik madde (mg/g)	10.73±0.34	9.23±0.89	*
Antioksidan kapasite			
DPPH (μmol Trolox/kg)	10.74±0.54	10.34±0.65	öd
ABTS (μmol Trolox/kg)	9.67±0.48	9.30±0.58	öd
Şeker Bileşimi (g/L)			
Sakkaroz	0.61±0.00	0.18±0.03	*
Glikoz	2.89±0.00	1.42±0.00	*
Fruktoz	2.30±0.01	1.43±0.20	*
TA (%)	0.09±0.01	0.10±0.00	öd
pH	5.85±0.75	5.6±0.5	öd
Tuz (%)	0.37	5.79	*

p-değeri: öd= önemli değil, * p<0.05

4.2. Taze ve Fermente Zeytindeki Fenolik Bileşikler

Çalışmamızda taze ve fermente zeytinde 21 adet fenolik bileşik bulunmuştur. Tanımlanan fenolik bileşiklerin, HPLC-DAD-ESI-MS/MS yardımıyla alıkonma zamanları (Rt), ultraviyole bölgedeki maksimum dalga boyları (λ_{max}), MS/MS'deki ana ve fragman iyonları tanımlanmış ve elde edilen veriler Tablo 4.2.'de verilmiştir. Bileşiklerin tanımlanmasında LC-MS/MS verilerinin yanı sıra standart olarak kullanılan maddelerin alıkonma zamanı, spektral verileri ve literatür verileri de kullanılmıştır.

Hidroksitirozol: Hidroksitirozolün tanımlanmasında tam tarama modunda kullanılmıştır. Negatif iyon modunda bu fenolik alkol için üretilen spektrum, CH₂OH grubunun kaybına bağlı olarak, ayrılmış molekülü [M-H]⁻ ve m/z 123 iyon fragmanını vermiştir (De la Torre-Carbot ve arkadaşları, 2005). MS analizinde, muhtemelen asit özellikleri ve iyonizasyonuna uygun olmayan çalışma parametreleri (solvent ve MS koşulları) nedeniyle, tirozol belirlenmemiştir. Bununla birlikte, m/z 137'de parçalanmış moleküle [M-H]⁻ karşılık gelen iyon, Seçilmiş İyon İzleme (SIM) mod analiziyle de taranmış ancak bu bileşik belirlenememiştir. Bu iki bileşik, özellikle antioksidan aktiviteleri ve sağlık açısından faydalı özellikleri bakımından birçok araştırmacı tarafından ele alınmıştır. Yapılan araştırmalarda hidroksitirozolün tirozole göre daha güçlü bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (Obied ve arkadaşları, 2005; Ryan ve Robards, 1998).

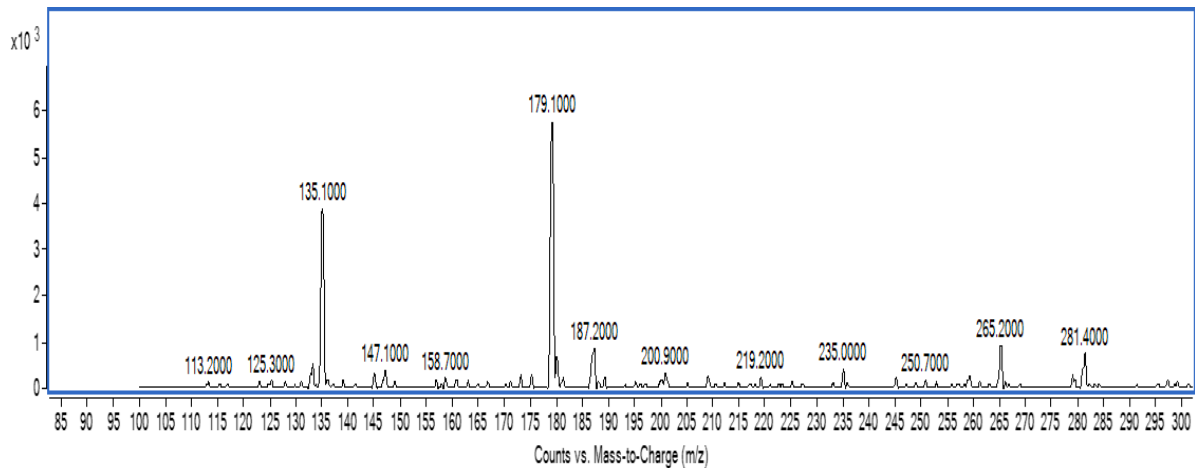


Şekil 4.1. Hidroksitirozole ait LC-MS/MS spektrumu

Hidroksitirozol glikozit: Hidroksitirozol glikozit 16.21 dakikada elüte olarak m/z 315'te ana iyon ve biri m/z 153' de diğeri m/z 123'te iki fragman iyon oluşturmıştır. Bu durum, bileşiğin bir hidroksitirozol hekzosit olarak tanımlanabilmesini sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda üç hidroksitiroz glukozit izomeri rapor edilmiştir (Bianco ve arkadaşları, 1998; Cardoso ve arkadaşları, 2005; Ryan ve arkadaşları, 2002). Bianco ve arkadaşları, (1998) hidroksitirozol-4-β-glukozidin, zeytin hamurunda baskın olan izomer olduğunu, Cardoso ve arkadaşları, (2005) zeytin pulpunda hidroksitirozol-1'-β-glukoziti baskın olarak tanımlamışlardır. Psödomoleküler iyonun m/z 315'teki fragmentasyon profili De Nino ve arkadaşları, (1999)'nın yaptığı çalışmaya büyük benzerlik göstererek bu bileşiği hidroksitirozol-1'-β-glukozit olarak tanımlamamızı sağlamıştır.

Elanolik asit: 53.05 dakikadaki alıkonma zamanlı, ESI-MS spektrumunun m/z 241'de yoğun bir iyon ile karakterize edilen, elenolik asitin yapısında bileşik belirlenmiştir.

Kaffeik asit: Kaffeik asidin tanımlanması, ESI-MS spektrumları ile saf standardın karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. Negatif iyon modunda bu fenolik asit için üretilen spektrumlar m/z 179'da parçalanmış molekülü [M- H]- ve CO₂ kaybına bağlı olarak m/z 135 [M- H- 44] 'te karakteristik bir fragman vermiştir.



Şekil 4.2. Kaffeik aside ait LC-MS/MS spektrumu

Tablo 4.2 Zeytinlerdeki fenolik bileşiklerinin alıkonma zamanı (Rt), dalga boyu (DAD) ve LC-DADESI-MSⁿ kütle spektral verileri

Peak no.	Alıkonma zamanı	Pseudomolecular ion [M-H] ⁻	Ana fragmant	Bileşikler	Taze (mg/100g)	Salamura (mg/100g)	p-değeri
1	18.47	153	123	Hidroksitirozol	80.65±1.34	119.89±2.08	*
2	16.207	315	153, 123	Hidroksitirozol glikozit	116.10±2.27	12.43±0.96	*
3	53.05	241	197	Elanolik asit türevi	337.10±5.66	46.71±0.72	*
4	34.85	179	135	Kaffeik asit	0.00±0.00	17.60±1.24	*
5	34.04	403	–	Elanolik asit glikozit	87.69±2.09	28.11±1.09	*
6	46.35	525	389, 319, 183	Dimetiloleropein	257.12±3.78	12.72±0.55	*
7	46.95	623	461, 161	Verbaskozit	589.25±4.82	5.56±0.27	*
8	47.96	447	285	Luteolin-7-glikozit	519.51±6.44	32.16±0.88	*
9	58.34	319	183, 139	OHTY-DEDA (Oleacein)	54.87±0.66	4.61±0.40	*
10	51.69	609	301	Rutin	297.24±3.55	84.63±1.04	*
11	36.65	377	307	Oleuropein aglikon	64.24±0.93	24.80±0.55	*
12	56.08	539	377, 307, 275, 225	Oleuropein	1141.42±2.94	35.46±0.84	*
13	52.35	447	301	Kuersetin-3-rhamnozit	252.63±5.44	36.11±0.79	*
14	53.45	447	285	Luteolin-4-glikozit	256.27±3.59	28.43±0.60	*
15	51.35	551	507, 389, 341	6'-β-Glikopironozil oleozit	85.54±1.26	25.40±0.55	*
16	52.91	338	431, 269	Apigenin-7-glikozit	63.61±1.97	14.13±0.37	*
17	55.95	535	491, 325	6'-Rhamnopyranozil oleozit	758.23±8.88	16.54±0.48	*
18	58.03	372	301,151	Kuersetin	65.42±0.78	9.47±0.43	*
19	59.34	523	361, 291, 259, 101	Ligstrosid	49.73±1.84	11.65±0.52	*
20	62.63	285	–	Luteolin	269.10±4.18	396.92±5.71	*
21	72.59	269	–	Apigenin	50.91±1.66	79.94±1.06	*
				Toplam	5396.63±43.01	1043.26±12.57	*

p-değeri: * p<0.05

Elenolik asit glukozit: Elenolik asit glukozit, m/z 403'te ana iyon göstermiştir. Bu durum zeytinlerde olgunlaşma ile azalan oleuropeinin [M-H]⁻ modunda parçalanma ürünü olan 11-metiloleosid (elenolik asit glukozit) in karakteristik iyonudur. Bu bileşik önceki çalışmalarda zeytinlerde tanımlanmıştır (Cardoso ve arkadaşları, 2005; Ryan ve arkadaşları, 1999; Ryan ve arkadaşları, 2002).

Rutin: Tam tarama modunda elde edilen ESI-MS spektrumu, negative iyonizasyon modunda m/z 609'da yoğun bir psödomoleküler iyon, m/z 301'de bir quercetin türevlerinin teşhisi olan bir fragman ve m/z 463'teki bir fragman ve ramnoza karşılık gelen 146 amu, bir kayıp saptanmıştır. Zeytinlerde rutin bileşiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Bouaziz ve arkadaşları, 2005; Cardoso ve arkadaşları, 2005; Ryan ve arkadaşları, 2002; Vlahov, 1992). Bu bileşiğin antioksidan, antienflamatuvar, anti-trombotik, sitoprotektif ve antimikrobiyal aktiviteler gösteren birçok biyolojik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Rajve arkadaşları, 2001).

Oleuropein aglikon: Çeşitli formları olan oleuropein aglikon taze ve fermente zeytinlerde tespit edilmiştir. Oleuropein türevleri için rapor edilenlere benzer şekilde MS fragmentasyon gösteren bu bileşik 36.65. dakikada elüte olmuştur (Caruso ve arkadaşları, 2000; De la Torre-Carbot ve arkadaşları, 2005). 377 m/z ana iyon ek olarak, kütle spektrumunda, C₄H₆O kaybı nedeniyle m/z 307'de bir fragman gözlemlenmiştir (Caruso ve arkadaşları, 2000).

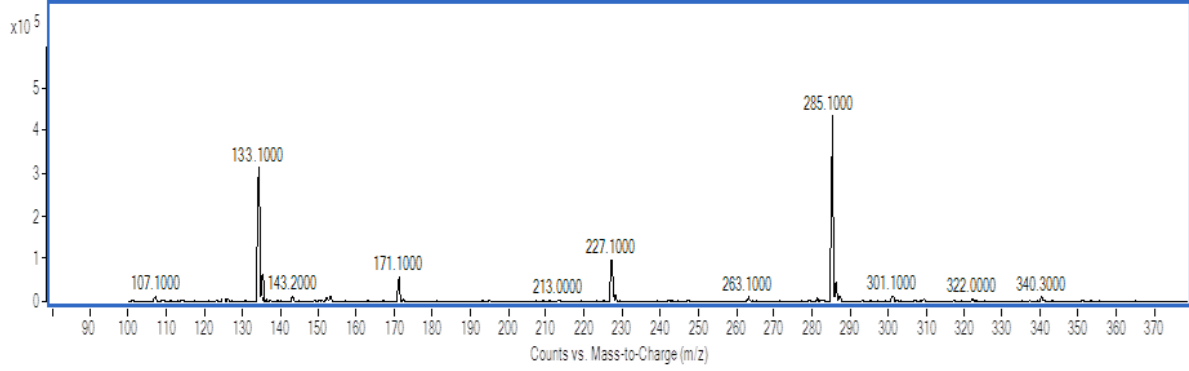
Dimetiloleuropein: Kütle spektrumu ve parçalanma profilinin incelenmesi ve literatürde bildirilen verilerle karşılaştırılmalarıyla (Ryan ve arkadaşları, 2002; Soler-Rivas ve arkadaşları, 2000) zeytinlerde demetiloleuropein tanımlanmıştır. Bu sekoiridoid glikositin kütle spektrumu, m/z 525'te, deprotonlanmış moleküle (MW 526 amu) karşılık gelen yoğun bir pik göstermiştir. CID ile elde edilen fragmentasyon profili, sırasıyla m/z 389'da m/z 319'da ve m/z 183'te üç ana fragman vermiştir. m/z 389'daki iyon, hidroksitiroz türevleri için karakteristik olan m/z 137'deki bir fragmanın pozitif iyon göstermiştir (De Nino ve arkadaşları, 1999). m/z 319'daki fragman, aglikonun karboksilik grubundan bir CO₂ molekülün kaybıyla oluşmuştur. Dekarboksimetil oleuropein aglikona karşılık gelen m/z 319 iyonunun daha fazla hidroksitirozol kaybı dekarboksimetil elenolik aside karşılık gelen m/z 183'te bir fragman oluşturmuştur. Zeytinlerde demetiloleuropein daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Ryan ve Robards, 1998); elenolik asit glukozit gibi, oleuropeinin

glikosile edilmiş türevi, meyve olgunlaşması sırasında birikmekte ve siyah olgunluk aşamasında maksimum seviyeye ulaşmaktadır (Soler-Rivas ve arkadaşları, 2000).

Her iki bileşiğin de zeytin olgunlaşması sırasında esterazların etkisiyle oleuropein kaynaklı olması mümkündür (Amiot ve arkadaşları, 1989).

Verbaskozit: Olea europaea meyveleri, oleuropein, ligstrosid ve demetileuropeinin yanı sıra, verbaskozit gibi (kaffeik asit ve hidroksitozol'ün heterosidik bir esteri) bileşenleri de içermektedirler (Soler-Rivas ve arkadaşları, 2000). Hem tam taramada hem de SIM modunda, Pisciotana çeşidinden elde edilen zeytin ekstraktlarında, m/z 623'teki bir iyonla (parçalanmış verbaskozit molekülü) karakterize edilen bir bileşik saptanmıştır. Bileşik, kütle spektrumu, alıkonma süresi ve HPLC-UV spektrumu ile bu bileşiğin ticari standardı karşılaştırıldığında verbaskozit olarak tanımlanmıştır. Negatif iyon modundaki baz, tanımlanması için yararlı olan birkaç düşük yoğunluklu fragman iyon ile (m/z 623) ile, MS fragmentasyonunda verbaskozit için karakteristik iki iyon, m/z 461 ve 161'de gözlenmiştir. Kaffeik asit kaybı, m/z 461'de bir iyon ve nötr bir fragman olarak bir keton üretirken, m/z 161'deki pik, bir proton transferinden kaynaklanmaktadır (Ryan ve arkadaşları, 1999).

Luteolin glukozit: Luteolin glukozitine karşılık gelen kütle spektrumuna sahip iki bileşik (RT 47.96 ve 53.45 dk) çalışmamızda tespit edilmiştir. Dialarboksimetil oleuropein aglikonun (OHTy-DEDA) dialdehidik formuyla birlikte elute olan ilk izomerin tanımlanması için ESI-MS ve HPLC-UV analizinde elde edilen spektrumlardan yararlanılmıştır. Bu iki luteolin-glukozit, psödomoleküler iyonun (m/z 447'de) baskın göstermiş ve parçalanmadan sonra (iyon kaynağının bazı çalışma parametrelerinin değiştirilmesiyle), 162 amu (glikoz kaybı) kaybına karşılık gelen m/z 285'te güçlü bir iyon vermiştir. İlk elüte olan bileşik alıkonma zamanı ve spektrumları ticari standardinkilerle karşılaştırarak luteolin-7-glukozit olarak tanımlanmıştır. Zeytinlerde glikozit formda iki luteolin tespit edilmiştir. Luteolin-4-glukozidin, ters fazlı HPLC analizinde luteolin-7-glukositten sonra çıkan tek izomer olduğu göz önüne alındığında, ikinci çıkan bileşiğin luteolin-4'-glukozit olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.3. Luteoline ait LC-MS/MS spektrumu

Kuersetin-3-rhamnozit: ESI-MS tarafından 52.35 dakikada elute olan bileşik için negatif iyonizasyon modunda üretilen spektrum, m/z 447'de yoğun bir iyon ve m/z 301'de bir fragman göstermiştir. Kuersetin-3-rhamnosit, zeytin hamurunda ve yapraklarında tespit edilmiş olmasına rağmen *O. europaea*'da tanımlanan flavonoidler arasında nadiren rapor edilmiştir (Ryan ve arkadaşları, 1999; Vlahov, 1992). Bu flavonoid için oksijen radikalının oluşturduğu DNA hasarı, anti-viral ve anti-enflamatuvar aktivite üzerinde antioksidan etki gösterdiği yönünde çeşitli biyolojik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Camuesco ve arkadaşları, 2004; Raj arkadaşları, 2001); aglikonunun (quercetin), düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) oksidatif modifikasyonlara karşı korumak ve serbest radikalleri temizlemede en etkili flavonoidlerden biri olmak için kardiyotonik, anti-neoplastik, anti-mikrobiyal ve anti-alerjenik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Raj Narayana ve arkadaşları, 2001).

6'- β -glukopironozil oksit: Bir oleuropein türevi olan bu bileşik Cardoso ve arkadaşları, (2005) tarafından zeytinlerde tanımlanmıştır (RT 51.35 dak). Bu bileşiğin ESI-kütle spektrumu, m/z 551'de ana iyon ve m/z 507, 389 ve 341 fragman iyonlar göstermiştir.

Oleuropein: Oleuropeinin LC-MS/MS analizlerinde 56.08 dakikada m/z 539'da yoğun ana iyon ve m/z 377, 275'te fragman iyon mevcudiyeti ile oleuropein tanımlaması yapıldı. ESI-MS spektrumu m/z 539'da bir ana iyon ve glikozil bağının ayrılmasıyla m/z 377'deki fragman iyon, vermektedir (Ryan ve arkadaşları, 1999); m/z 307'deki iyon, bir C_4H_6O fragmanının kaybıyla ilişkilidir (Caruso ve arkadaşları, 2000), m/z 275'teki fragman yeniden düzenlenmiş fragmanlardan (De la Torre-Carbot ve arkadaşları, 2005); m/z 223'te ester fonksiyonunun yeniden düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır (Ryan ve arkadaşları, 1999). Beklendiği gibi, taze ve fermente zeytinlerde fenolik fraksiyonunun ana bileşenlerinden biri olan oleuropein, çalışmamızda da baskın bileşiklerden biri tanımlanmıştır. Bu sekoiridoid, zeytin ağaçlarının hastalığa karşı direnç göstermesine katkı sağlamakta (Soler-Rivas ve arkadaşları, 2000);

zeytinlerde ise acı tada neden olmaktadır (Gutierrez-Rosales ve arkadaşları, 2003) ve ayrıca kateşol kısmından dolayı anti-oksidan özellikler göstermektedir (Visioli ve Galli, 1994).

6'-b-Rhamnopiranozil oleosit: Bu bileşiğin MS spektrumu, m/z 535'te, parçalanmış moleküle [M-H] karşılık gelen yoğun bir ana iyon vermiştir. Cardoso ve arkadaşları (2005), zeytinlerde, 536 amu'luk moleküler kütleyle sahip bir oleozid türevi tespit etmişlerdir.

Ligstrosid: Başka bir fenolik glukozit olan ligstrosidin tanımlanması, m/z 523 [M - H]⁻ 'de psödomoleküler iyon ve m/z 361 ve m/z 291'de iki fragman ile karakterize edilen fragmantasyon spektrumlarının incelenmesi ile gerçekleştirildi. Oleropein için rapor edildiği gibi, bu fragmanlar sırasıyla glikosil bağının (m/z 361) bölünmesine ve bir C₄H₆O fragmanının kaybına karşılık gelmektedir (Caruso ve arkadaşları, 2000). Daha önce bildirildiği gibi yeniden düzenleme parçalarına bağlı olabilecek m/z 259 ve 101'deki iyonlar da gözlenmiştir (De la Torre-Carbot ve arkadaşları, 2005).

Luteolin ve apigenin: 62.63 dakikada alıkonma zamanı gösteren luteolin m/z 285'te yoğun bir iyon ile karakterize edilen bir ESI kütle spektrumunu göstermiştir. Apigenin ise 72.59 dakikadaki alıkonma zamanı ve kütle spektrumunda m/z 269'da yoğun ana iyon göstermesiyle ve HPLC-UV analizi ile tanımlanmışlardır. Çeşitli çalışmalarda, bu flavonoidler, farklı kültür bitkilerinin zeytin meyvelerinde tespit edilmiştir (Bouaziz ve arkadaşları, 2005; Owen ve arkadaşları, 2003; Ryan ve arkadaşları, 2002) ve enflamatuar, anti-mikrobiyal, kardiyotonik aktivite, serbest radikalleri temizleme ve düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe etme gibi önemli biyolojik özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir (Raj Narayana ve arkadaşları, 2001).

Fenolik bileşiklerin miktarsal değerlendirilmesi yapıldığında zeytindeki fenolik bileşenlerin toplam miktarının 1043.26- 5396.63 mg/100 g arasında değiştiği saptanmıştır. Taze zeytinde baskın olarak bulunan fenolik bileşikler, oleuropein, 6'-Rhamnopiranozil oleoside, verbaskozit, luteolin-7-glikozit olarak bulunmuştur. Fermantasyon işlemine maruz kalmış zeytinde bulunan baskın fenolik bileşikler, luteolin ve hidroksitirozol olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonrasında miktarları artan/ortaya çıkan fenolik bileşikler; "hidroksitirozol, kaffeik asit, luteolin, aglikon" olmak üzere 4 tanedir. Geri kalan 17 adet bileşiğin miktarlarında azalma tespit edilmiştir. En fazla azalma oleuropein, 6'-Rhamnopiranozil oleoside ve kuersetin-3-rhamnozid'de gözlemlenmiştir. Önceden yapılan birçok çalışmada da

belirtildiği gibi zeytin meyvelerinin ana fenolik bileşeni oleuropein olarak tespit edilmiştir (Gómez-Rico ve arkadaşları, 2008; Erten ve arkadaşları, 2018). Oleuropein işlenmemiş yeşil zeytinin yüksek oranda acılığından sorumlu baskın bir fenolik bileşiktir ve zeytinin hemen tüketilmemesine, patojenlere ve herbivorlara karşı bir savunma mekanizması oluşturmasını neden olur. Yapılan bir çalışmada oleuropeinin, *Haemophilus influenza*, *Salmonella typh*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakteri ve mikrofungusların büyüme oranını inhibe ettiği veya geciktirdiği bulunmuştur (Bisiganano ve arkadaşları, 1999). Oleuropein, sofralık zeytinlerde birkaç farklı mekanizma yoluyla azaltılabilir.

Güçlü asitler veya bazlar doğrudan serbest yağlara nüfuz edebilir, burada serbest H ve OH iyonları, hidroksitirozol/tirozolü elenolik asit grubuna bağlayan ester grubunda oleuropein/ligstrosidin hidrolizini katalize eder. Bu hidroliz reaksiyonu acı olmayan hidroliz ürünleri oleosidad metil ester ve hidroksitirozol/tirozol üretir (Soler-rivas, 2000). Zeytin eti, glikoz ve elenolik asit kısmı arasındaki ester bağında oleuropeini hidrolize edebilen β -glikosidaz ve esteraz içeren endojen enzimler içerir (Romero-Segura ve arkadaşları, 2009). Endojen enzimler, meyve olgunlaşması sırasında veya meyve mekanik hasar nedeniyle yaralandığında meyvenin içindeki fenolik bileşikler hidrolize eder ve hidroliz ısı ile etkisiz hale getirilmedikçe fermantasyon sırasında devam eder (Ramírez ve arkadaşları, 2016).

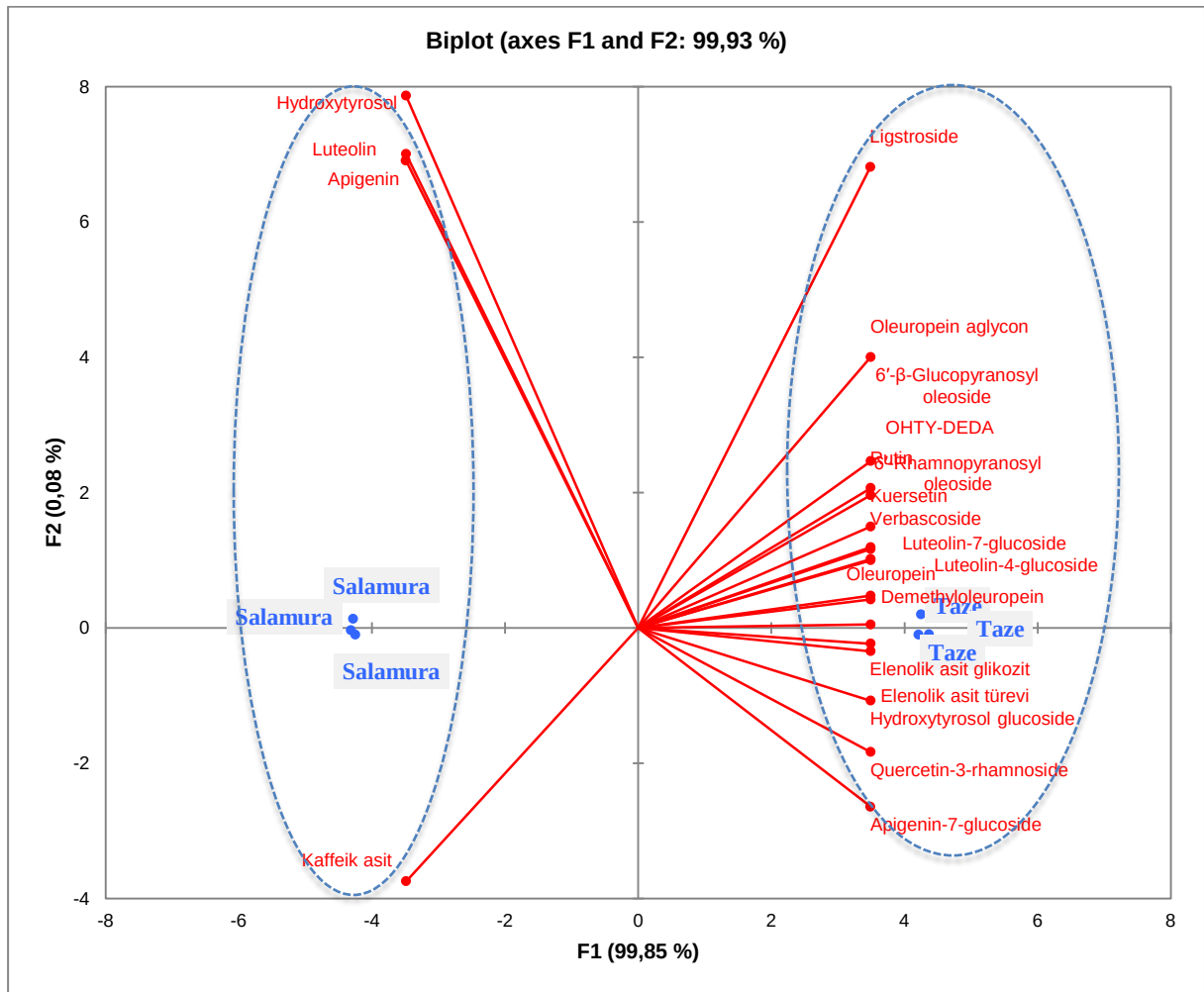
Tuzlu su bazlı işleme sırasında acı fenolikler meyveden toplanan tuzlu suya difüze edilerek zeytinden uzaklaştırılır. Bu bileşikler tuzlu su içerisine dağıldıklarında, glukozidazın ve esterazın asit ve/veya enzimatik etkisi, zeytin tuzlu suyunda veya yüzeyinde bulunan mikrobiyotadan elde edilen esteraz fenolik bileşikler hidrolize edebilir (Romero ve arkadaşları, 2016). Fenolik bileşikler zeytinden difüze olurken, tuzlu sudan gelen tuz ve asit dağılırken, ürünün kimyasal ve duyuşal profilini değiştirir (Maldonado ve arkadaşları, 2008). Zeytinin hücresel yapısı, kimyasal, fiziksel (kıрма, çizme) veya doğal biyokimyasal yumuşama ile tehlikeye girerse, dağılma daha hızlı gerçekleşebilir. Oleuropein taze zeytinde 1141.42mg/100 g, salamura zeytinde ise miktarı yüzde %96'lık bir azalmayla 35.46 mg/100 g olarak bulunmuştur. Hidroksitirozol yukarıda bahsedildiği gibi oleuropeinin başlıca bozunma ürünlerinden biridir ve konsantrasyon değeri taze zeytinde 80.65 mg/100g iken, salamura zeytinde 119.89 mg/100 grama yükseldi. Hidroksitirozol konsantrasyonunun artırılması, oleuropein hidrolizini katalizleyen hidrolitik enzimlerin, özellikle glukozidaz ve esterazların, oleuropein aglikon ve elenolik asit üretimi ile artan aktivitesine atfedilebilir (Bouaziz, 2005). Yapılan bir çalışmada Serinyol, Bahçe, Sariçam, Tarsus ve Mudanya bölgelerinden alınan Gemlik çeşidine ait zeytin örnekleri meyve olgunlaşması sırasında beş farklı zamanda toplanmışlar ve fenolik bileşiklerin değişimi incelemişlerdir. Çalışılan yerlerin çoğunda,

zeytin meyvelerinin ana fenolik bileşeni olan oleuropein tespit edilmiştir. Bu durum bizim çalışmamızda ve daha önceden birçok zeytin çeşidinde (Vinha ve arkadaşları, 2005; Gómez-Rico ve arkadaşları, 2008; Özcan ve arkadaşları, 2013; Tamendjari ve arkadaşları, 2016) belirtildiği gibi paralellik göstermiştir. Ancak, en fazla bulunan fenolik bileşiğin, vanilik asit (Uylaşer, 2015), apigenin (Aktas ve arkadaşları, 2014) veya hidroksitiroz (Dağdelen ve arkadaşları, 2013) olduğu rapor edilen Gemlik zeytinleri ile ilgili daha önceki bulgularla çelişmektedir. Mudanya'dan alınan örnekte oleuropein açısından en zengin olanı (1391 mg/kg'dı), en zayıf örnekler ise Serinyol (56.2 mg/kg) örneklerinde bulunmuştur. Bu farklılık, pedoklimatik durum ve fenolik bileşiklerin metabolizmasının düzenlenmesinde mevsim gibi deneysel koşulların önemini gösterebilir (Erten ve arkadaşları, 2018). Othman ve arkadaşları, (2009) da yapmış olduğu bir çalışmada Meski çeşidi yeşil ve siyah zeytin ve Tounsi çeşidi pembe-mor renkli zeytinleri tuzlu suda beklektikten sonra lye işlemi, Besbesi çeşidi zeytine ise kuru tuzlama yöntemi uygulanmıştır. HPLC ile analizleri sonucunda 14 adet fenolik bileşik saptamışlardır. Ana fenolik bileşenler olarak hidroksitirozol ve tirozol'u saptarken, oleuropein örneklerin hiçbirinde tespit edilememiştir. Oleuropeinin salamura işlemi sonrasında belirgin şekilde azaldığını ve lye işleminden sonra ise tamamen kaybolduğunu belirlemişlerdir.

Meski çeşidi yeşil zeytinde diğer çeşit zeytinlere göre daha yüksek hidroksitirozol bulmuşlar ve miktarı 274.8 mg/100 g'dır. Meski çeşidinin siyah renkli zeytininde ise 35.55 mg/100 g, pembe-mor renkli olan Tounsi çeşidi zeytinde 83.34 mg/100 g olarak bulunmuş. Kuru tuzlama işleminde su kaybı önemli miktarda fazladır ve hidroksitirozol suda yüksek çözünürlüğe sahip olduğu için Besbesi çeşidi zeytinde bu bileşik bulunamamıştır. Son ürünlerdeki fenolik bileşiklerin profilleri, kullanılan meyvenin çeşidine ve uygulanan işleme yöntemlerinden dolayı önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Selli ve arkadaşları, (2018), zeytin numunesinde HPLC-DAD-ESI-MS/MS cihazı ile yaptıkları analizde toplam 20 majör fenolik bileşik tanımlamıştır. Tanımlanan bileşikler içerisinde en yüksek luteolin-7-glukozit içeriği (306mg/kg) bulunmuştur ve sonrasında verbaskozit (271mg/kg), oleuropein (231mg/kg) ve hidroksitirozol (221mg/kg) olarak tespit edilmiştir. Zeytin fenolik bileşimi hem kalite hem de miktar bakımından oldukça değişkendir (Uccella, 2001; Vinha ve arkadaşları, 2005). Zeytinin işleme yöntemi, sulama rejimleri, çeşit ve olgunlaşma derecesi değişkenliğe sebep olabilir (Ryan ve diğerleri, 1999; Patumi ve arkadaşları, 2002; Romero ve arkadaşları, 2004). En baskın ikinci fenolik bileşen olan 6'-Rhamnopyranosil oleoside'in taze meyvedeki miktarı 758.23 mg/100g iken fermantasyon sonrasında %97'lik bir azalma ile 16.54 mg/100 g olarak bulunmuştur. Bu bileşik ilk defa tanımlanmıştır. Biyoaktif moleküller sofralık zeytin ve yağın

duyusal niteliklerinden (renk, aroma ve lezzet) sorumludur ve zeytinyağının raf ömrünü arttırır (Bouaziz ve arkadaşları, 2004). Bu özelliklere katkıda bulunan başlıca önemli fenolik bileşikler, özellikle oleuropein hidroksitirozol ve verbaskozit'dir (Charoenprasert ve Mitchell, 2012). Çalışmamızda verbaskozit bileşiği taze zeytinde 589.25 mg/100 g, salamura zeytinde ise miktarı 5.56 mg/100 g olarak belirlenmiştir. Sahan ve arkadaşları, (2013), verbaskozit konsantrasyonu Gemlik cinsinde yeşil olgunlaşmadan (98.05 mg/kg) siyah olgunlaşma aşamasına (220.50 mg/kg) yükseldiğini ve en yüksek verbaskozit konsantrasyonu, salamuradaki siyah zeytinlerde (410.33 mg/kg) tespit edilirken, en düşük konsantrasyonu, İspanyol tarzı işlenmiş yeşil zeytinlerde (43.01 mg/kg) bulmuştur. Yapılan başka bir çalışmada yeşil salamura zeytindeki fenolik bileşenlerin fermentasyon süresine bağlı olarak değişimi incelenmiş, başlangıçta olmayan verbaskozit 120 günün sonunda 65.39 ± 0.41 mg/100g olarak tespit edilmiştir (Randazzo ve arkadaşları, 2019). Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi diğer çalışmalardan farklı olarak meyve olgunlaştıkça verbaskozit değerinde düşme gözlemlenmiştir. Oleuropeinin degradasyonunun hidroksitirozol'ü üretebileceği ve daha sonra verbaskozite'e dönüştürülebileceğini belirtmişlerdir (Jemai ve arkadaşları, 2009). Taze zeytinde baskın olarak bulunan bir diğer bileşik olan luteolin, luteolin-7-glikozit, luteolin-4-glikozit miktarları sırasıyla 269.10 mg/100 g, 519.51 mg/100 g, 256.27 mg/100 g iken salamura işlemi sonrasında olgunlaşan zeytinde 396.92 mg/100 g, 32.16 mg/100 g, 28.43 mg/100 g olarak bulunmuştur. Luteolin miktarı olgunlaşma ile artarken (%47), luteolinin glikozitlerinin miktarında azalma gözlemlenmiştir. Deiana ve arkadaşları, (2017), doğal fermentasyon işlemine tabi tuttukları zeytinde 7 tane fenolik bileşik tespit etmişlerdir. Bunlardan biri olan luteolin-7-glikozit miktarını 27.8 ± 15.5 mg/kg olarak bulmuşlardır. Yapılan başka bir çalışmada taze zeytinde luteolin-7-glikozit tespit edilmiş ve miktarı 279 ± 18.8 mg/g, kuru tuzlama işlemi sonrası 11.9 ± 1.0 mg/g, salamura işlemi sonrasında ise 4.5 ± 0.3 mg/g olarak bulunmuştur (Melliou ve arkadaşları, 2015). Yapılan başka bir çalışmada siyah kuru tuzlu Gemlik zeytinin lezzetini oluşturan toplam 20 ana fenolik bileşik bulunmuş ve en bol bulunan fenolik bileşik olan luteolin-7-glukozit (306mg/kg) olduğu belirtilmiştir (Selli ve arkadaşları, 2018). Elanolik asit türevi, elanolik asit glikozit ve oleuropein aglikon, esteraz enziminin etkisiyle parçalanarak oleuropein ile bağlantılı olarak azalma göstermişlerdir. Taze ve salamura zeytindeki değerleri sırasıyla elanolik asit için, 337.10 mg/100 g'dan 46.71 mg/100 g değerine, elanolik asit glikozit için 87.69 mg/100 g'dan 28.11 mg/100 g'a ve oleuropein aglikon için ise 64.24 mg/100 g'dan 24.80 mg/100 g'a doğru azaldığı bulunmuştur. Kaffeik asit taze zeytinde bulunmazken fermentasyon sonrasında meydana gelmiş ve miktarı 17.60 mg/100 g'dır. Fermentasyon sonrası miktarları azalan diğer bileşikler

şunlardır: kuersetin-3-rhamnozit ve kuersetin %85'lik azalma ile sırasıyla, 36.11 mg/100 g, 9.47 mg/100 g'a, %95'lik azalmayla dimetiloleopein 12.72 mg/100 g, OHTY-DEDA (Oleacein) taze meyvede 54.87 mg/100g iken fermente olmuş zeytinde 4.61 mg/100 g, rutin bileşiği taze meyvede 297.24 mg/100 g fermentede 84.63 mg/100 g, 6'- β -Glikopironozil oleoside taze meyvede 85.54 mg/100 g, fermentede 25.40 mg/100 g ve son olarak ligstrosid bileşiği taze meyvede 49.73 mg/100 g iken fermentede 11.65 mg/100 g olarak bulunmuştur. Özcan ve arkadaşları, (2013), yaptığı çalışmada apigenin bileşiği majör fenolik bileşen olarak bulunmuştur. Çalışmamızda apigenin bileşiğinin fermentasyon sonrasında miktarı artmıştır. Taze meyvede 50.91 mg/100 g iken %58'lik bir artış ile miktarı 79.94 mg/100 g'dır.



Şekil 4.4. İki ana bileşen için taze ve salamura zeytin fenoliklerinin PCA sonuçları

Taze ve salamura zeytinlerin fenolik bileşikler bakımından değerlendirilmesinde temel bileşen analizleri (PCA) kullanılmıştır. Taze ve salamura zeytinlerin fenolik bileşikler için

PCA modeli, toplam varyansın % 99.93'ünü açıklayan üç temel bileşenle oluşturulmuştur (Şekil 4.4.) PC1 %99.85 ve PC2 toplam varyansın % 0.08'ini oluşturmuştur. Analizlerde iki temel grup oluşmuştur. Grafiğin sağ tarafı taze zeytin örneklerini ve sol tarafı ise salamura zeytin örneklerini içermektedir. Grafikten gözlemlenebileceği gibi, salamura zeytinler kafeik asit, hidroksitirozol, luteolin ve apigenin ile karakterize olarak grup oluştururken diğer saptanan fenolikler taze zeytinleri karakterize etmişlerdir. PCA analizleri ayrıca taze zeytinlerde glikozit yapının salamura zeytinlerde ise aglikon yapının karakteristik özellik gösterdiği saptanmıştır.



5. SONUÇLAR

Adana yöresinden alınan Gemlik çeşidi yeşil zeytin doğal yöntemle fermentasyon prosesine tabi tutulmuştur. Hem taze hem de fermente zeytinin, şeker analizi, toplam asitlik, pH, renk, fenolik madde miktarı, antioksidan kapasite potansiyeli, fenolik madde bileşenleri ve miktarları araştırılmıştır.

- Tez çalışmamız kapsamında taze ve fermente zeytinde yapılan analizler sonucunda; sakkaroz, glikoz ve fruktoz olmak üzere 3 adet şeker belirlenmiştir. Bu şekerlerin toplam miktarı 3.03-5.80 g/L arasında değişmiştir. Taze zeytinde baskın olan şeker glikoz, fermente zeytinde ise baskın olan şeker fruktoz olarak bulunmuştur. Toplam şeker miktarı fermentasyon işlemi sonucunda azalma gözlenmiştir.
- Taze ve fermente zeytinde titrasyon asitliği (%), 0.09 ile 0.10, pH 5.85 ile 5.6 arasında değişmiştir. Fermentasyon işlemi ile birlikte sofralık zeytindeki asitlik miktarı artmış. pH ise azalmıştır.
- Analizi yapılan zeytinlerin renk özelliklerinde L*, a*, b*, c* ve h (hue) değerlerinden yararlanılmıştır. Taze zeytinlerin fermentasyon sonrasında parlaklığının (L*) ve renk tonunun (H) arttığını, ham zeytinin yeşil olan renginin, fermentasyon etkisiyle sarı renge dönüştüğü tespit edilmiştir.
- Toplam fenolik madde zeytinde 9.23- 10.73 mg/g arasında değişmiştir. Fermentasyon işlemine bağlı olarak toplam fenolik madde miktarında azalış meydana gelmiştir.
- Zeytinlerde DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite 10.34-10.74µmol Trolox/kg, ABTS yönteminde ise 9.30-9.67 µmol Trolox/kg olarak değiştiği saptanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda antioksidan aktivite değerlerinin toplam fenolik madde içeriğiyle paralel bir azalma eğiliminde olduğu görülmüştür
- Taze ve fermente zeytin örneklerinde 21 adet fenolik bileşik bulunmuştur. Zeytindeki fenolik bileşenler 1043.26- 5396.63 mg/100 g arasında değişmiştir.
- Taze zeytinde baskın olarak bulunan fenolik bileşikler, oleuropein, 6'-rhamnopyranozil oleozit, verbaskozit, luteolin-7-glikozit olarak bulunmuştur. Çalışmamızda 6'-rhamnopyranozil oleozit bileşiği ilk defa belirlenmiştir.

- Fermantasyon sonrasında hidroksitirozol, kafeik asit, luteolin ve apigenin bileşiklerinin miktarları artış göstermiştir. Geri kalan 17 adet bileşiğin miktarlarında azalma tespit edilmiştir. En fazla azalma oleuropein, 6'-rhamnopyranosil oleozit ve kuersetin-3-rhamnozid bileşiklerinde gözlemlenmiştir.
- Salamura zeytinler kafeik asit, hidroksitirozol, luteolin ve apigenin ile taze zeytinler ise karakterize edilerek grup oluştururken diğer saptanan fenolikler taze zeytinleri ise verbaskozit, luteolin-7-glikozit, hidroksitirozol glikozit, elanolik asit türevi, oleuropein, 6'-rhamnopyranosil oleozit, rutin ve luteolin ile karakterize olmuştur.
- Taze zeytinlerde glikozit yapının salamura zeytinlerde ise aglikon yapının baskın olduğu saptanmıştır.



KAYNAKLAR

- Aktan N., & Kalkan H., (1999). Table Olive Technology. İzmir, Turkey: Ege University Press.
- Aktaş, A.B., Özen, B., Tokatlı, F., Şen, I., (2014). Phenolics Profile of a Naturally Debittering Olive in comparison to Regular Olive Varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (4), 691–698.
- Amiot, M. J., Fleuriet, A., Macheix, J. J. (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28, 67–70.
- Amiot, M. J., Fleuriet, A., Macheix, J. J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 34, 823–826.
- Andreasen, M.F., Christensen, L.P., Meyer, A.S., Hansen, Å. (2000). Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 rye (*Secale cereale* L.) varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, 48, 2837–2842.
- Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Duran-Quintana, M. C., Rodríguez- Gómez, F., Romero-Barranco, C., and Garrido-Fernández, A. (2008) Improvement of the storage process for cracked table olives. *Journal of Food Engineering*, 89, 479–487.
- Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez- Díaz, R., et al. (2012). Potential benefits of the application of yeast starters in table olive processing. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–4.
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello M., Tarocchi, M., Galli, A., Balsano, C., (2014). Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 18508-18524.
- Bianchi, G., (2003). Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Vol. 105, pp. 229-242.
- Bianchi, G., Pozzi, N. (1994). 3,4-dihydroxyphenylglycol, a major C₆±C₂ phenolic in *Olea europaea* fruits. *Phytochemistry*, 35, 1335- 1337.
- Bianco, A., Mazzei, R. A., Melchioni, C., Romeo, G., Scarpati, M. L., Soriero, A. (1998). Microcomponents of olive oil- III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl) ethanol-. *Food Chemistry*, 63, 461-464.
- Bianco, A., Uccella N., (2000). Biophenolic components of Olives, *Food Research International*, 33, 475-485pp.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisa, G., Uccella, N., Saija, A. (1999). On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 971-974.
- Bonatsou, S., Tassou, C. C., Panagou, E. Z., Nychas, G. J. E. (2017). Table olive fermentation using starter cultures with multifunctional potential. *Microorganisms*, 5, 1- 16.

- Boskou, D. (1996) Olive oil Chemistry and Technology. AOCS Press, Champaign, IL, pp 52–83.
- Boskou, G., Salta, F.N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A., Andrikopoulos, NK., (2006). Antioxidant Capacity and Phenolic Profile of Table Olives from the Greek Market, Food Chemistry, 94, 558-564pp.
- Boss, A., Bishop, K. S., Marlow, G., Barnett, M. P., Ferguson, L. R. (2016). Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future Directions. *Nutrients*, 8(8), 513.
- Bouaziz, M., Chamkha, M., Sayadi, S. (2004). Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar ‘Chemlali’ from Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5476-5481
- Bouaziz, M., Grayer, R. J., Simmonds, M. S. J., Damak, M., Sayadi, S. (2005). Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 236–241.
- Bouaziz, M., Sayadi, S. (2005). Isolation and Evaluation of Antioxidants From Leaves of a Tunisian Cultivar Olive Tree. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 497–504.
- Breidt, F., McFeeters, R. F., Perez-Diaz, I., Lee, C. (2013). Fermented vegetables. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Buchanan, R.L. (Ed.), ASM Press, Washington D.C., pp. 841-855.
- Brenes, M., Rejano, L., Garcia, P., Sánchez, A.H., Garrido, A. (1995). Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2702–2706.
- Cano-Lamadrid, M., Hernández, F., Corell, M., Burló, F., Legua, P., Moriana, A., Carbonell-Barrachina, A. A. (2016). Antioxidant capacity, fatty acids profile, and descriptive sensory analysis of table olives as affected by deficit irrigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016 (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.7744
- Cardoso, S. M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J.A., Renard, C. M. G. C., Coimbra, M. A. (2005). Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85,21-32.
- Caruso, D., Colombo, R., Patelli, R., Giavarini, F., Galli, G. (2000). Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1182–1185.
- Charoenprasert, S., Mitchell, A. (2012). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60,708
- Cimato, A., Marranci, M., Tattini, M. (1990). The use of foliar fertilization to modify sinks competition and to increase yield in olive. *Acta Horticulture*, 286, 175–178.
- Covas, M.I., De la Torre, K., Farré-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López- Sabater, C., Pujadas-Bastardes, M.A., Joglar, J., Weinbrenner, T., Lamuela- Raventós, R.M., De la Torre,

- R., (2006). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 608–616.
- Cunha, S.C., Ferreira I., Fernandes J.O., Faria M.A., Beatriz M., Oliveira P.P., Ferreira M. A. (2001). Determination of lactic, acetic, succinic and citric acids in table olives by HPLC/UV. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24 (7):1029-1038.
- 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.
- De la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventós, R. M., Lo'pez-Sabater, M. C., (2005). Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53,4331-4340.
- De Nino, A., Mazzotti, F., Morrone, S.P., Perri, E., Raffaelli, A., Sindona, G. (1999). Characterization of Cassanese olive cultivar through the identification of new trace components by ionspray tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 34, 10-16.
- Deiana, M., Serreli, G., Incani, A., Atzeri, A., Angioni, A., Campus, M., Cauli, E., Zurru, R. (2007). Antioxidant Effect of Natural Table Olives Phenolic Extract Against Oxidative Stress and Membrane Damage in Enterocyte-Like Cells. *Journal of Food Science*, 82, No. 2, 2017.
- Dıraman, H.(2007). Gemlik Zeytin Çesidinden Üretilen Naturel Zeytinyağlarının Oksidatif Stabilitelerinin Diğer Önemli Yerli Çesitler ile Karşılaştırılması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 3: 53–59.
- Durlu-Özkaya, F., Özkaya, M., (2011). Oleuropein using as an Additive for Feed and Products used for Humans. *Journal of Food Processing and Technology* 2:113.
- Erten, H., Ghorbal, A. B., Kelebek, H., Leventdurur, S., Ağırman, B., Boyacı-Gündüz, C.P., Carşanba, E., Darıcı, M. (2018). Influence of Geographic Origin on Agronomic Traits and Phenolic Content of cv. Gemlik Olive Fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 74 (2018) 1–9.
- Esti, M., Cinquanta, L., La Notte, E., (1998). Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46:32–35.
- Fernández Díez, M. J. (1983). *Olives Biotechnology: Food and feed production with microorganisms* (pp. 379–397). Florida: Verlag. Gandul-Rojas,
- Garrido Fernandez, A., Fernandez Díez, M.J., Adams, M. R. (1997). *Table Olive, Production and Processing*, Chapman and Hall, First Edition, Londra, 496p.
- Gilani, A.H., Khan, A.U. (2009). Medicinal value of novel combination of cholinergic and calcium antagonist constituents in olive. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*;

- Preedy, V.R., Watson, R.R., Eds.; Academic Press Elsevier: Amsterdam, the Netherlands, pp. 835–843.
- Gilani, A.H., Khan, A.U., Shah, A.J., Connor, J., Jabeen, Q. (2005) Blood pressure lowering effect of olives is mediated through calcium channel blockade. *International Journal of Food Science Nutrition* 2005, 56, 613–620.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., Salvador, M.D., (2008). Effect Of Cultivar and Ripening on Minor Components in Spanish Olive Fruits and Their Corresponding Virgin Olive Oils. *Food Research International* 41 (4), 433–440.
- Gourama, H., Bullerman, L.B. (1987). Effects of Oleuropein on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus Parasiticus*. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 1987, 20, 226–228.
- Heperkan, D., Dazkir, G.S., Kansu, D.Z., Güler, F.K. (2009). Influence of temperature on citrinin accumulation by *Penicillium citrinum* and *Penicillium verrucosum* in black table olives. *Toxin Reviews*, 2009, 28, 180–186.
- Huang, C.L., Sumpio, B.E. (2008). Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Surgeons*, 207, 407–416.
- Hughenoltz, J., Kleerebezem, M., (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and result of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 492-497.
- Hylckama, Vlieg van J. E. T., Hughenoltz, J., (2007). Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal* 17: 1290-1297.
- International Olive Council, IOC. (2016). World Table Olive Figure. Market Newsletter No 108.Kaltsa.
- Irmak, Ş., Öztürk Güngör, F., Susamcı, E., (2010). Bazı Sofralık Zeytin Çeşitlerimizin Toplam Fenolik Madde Miktarları ve İşleme Tekniklerinin Bu Bileşikler Üzerine Etkileri. *Zeytin Bilimi* 1 (2) 2010, 57-64
- Jemai, H., Bouaziz, M., Sayadi, S. (2009). Phenolic composition, sugar contents and antioxidant activity of Tunisian sweet olive cultivar with regard to fruit ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 2961-2968.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W. (2011). An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3): 248-260.
- Kadalkal, E., (2009). Gemlik Yöntemi İle İşlenmiş Gemlik Tipi Sofralık Zeytinlerin Antioksidan Özellikleri ve Fenolik Profilleri. *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*.
- Karaca, H., Emine Dinçer, E., Kıvanç, M., (2010). Metabolik Mühendisliğinde Laktik Asit Bakterileri. *Akademik Gıda* 8 (1), 32-38.
- Kiritsakis, A.K., (1998). *Olive Oil From Tree to the Table*, 2nd Edition. Food&Nutrition PressIn.; 347.

- Kiai, H., Hafidi, A., (2014). Chemical Composition Changes In Four Green Olive Cultivars During Spontaneous Fermentation, *LWT- Food Science and Technology*, doi: 10.1016/j.lwt.2014.02.011.
- Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 232-237.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinene, T., Aromaa, A. (2002), Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560–568.
- Kountouri, A.M., Mylona, A., Kaliora, A.C., Andrikopoulos, N.K. (2007). Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine* 14:659–67.
- López-lópez, A., Jiménez-araujo, A., García-garcía, P., Garrido-fernández, A. (2007). Multivariate Analysis for the Evaluation of Fiber, Sugars, and Organic Acids in Commercial Presentations of Table Olives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2007, 55, 10803–10811.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. (2010). *Brock Biology of Microorganisms*, 13th ed., Benjamin Cummings: San Francisco, CA, USA, 2010; ISBN 9780321726759.
- Maldonado, M. B., Zuritz, C., Assof, M. V. (2008). Diffusion of Glucose and Sodium Chloride in Green Olives During Curing as Affected by Lye Treatment, *Journal of Food Engineering*, vol. 84, no. 2, pp. 224–230, 2008.
- Markin, D., Duek, L., Berdicevsky, I. (2003). In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses.*, 46(3-4), 132-6.
- Melliou, E., Zweigenbaum, J. A., Mitchell, A.E., (2015). Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography Triple-Quadrupole Tandem Mass Spectrometry Quantitation of Polyphenols and Secoiridoids in California-Style Black Ripe Olives and Dry Salt-Cured Olives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63, 2400–2405.
- Naczk, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatography A*, 1054, 95–111.
- Neuhouser, M.L. (2004). Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, 50, 1–7.
- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 823-837.
- Othman, N. B., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P., Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, 116, 662e669.

- Özay, G., Borcaklı, M., Alperden, I., Ozsan, E., Erdek, Y. (1994). Gemlik ve Edincik zeytin türlerinin fermentasyon esnasındaki mikrobiyal ve kimyasal bileşimlerdeki değişimler. *Gıda Dergisi* 19 (1): 37-43.
- Özcan, N., Dağdelen, A., Tümen, G., Dünder, E. (2013). Phenolic profiles of olive fruits (*Olea europaea* L.) and oils from Ayvalık, Domat and Gemlik varieties at different ripening stages. *Food Chemistry* 136 (2013)41-45.
- Özdemir, Y. (2011). Bazı Melez Zeytinlerin Fizikokimyasal Özelliklerinin ve Starter Kültür (*Lactobacillus plantarum*) İlaveli Sofralık Zeytin Fermentasyonuna Uygunluklarının Belirlenmesi (Doktora Tezi). Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Özdemir, Y., Aktepe Tangu, N., Güven, E., Keskinel, Ö. (2015). G20/1 ve G20/7 Klonlarına Ait Zeytinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin ve Gemlik Çeşidinkiler İle Karşılaştırılması. *Bahçe* 44 (2): 81 – 88 (2015).
- Panizzi, L., Scarpati, M. L., Oriente, E. G. (1960). Structure of Oleuropein, Bitter Glycoside with Hypotensive Action of Olive Oil. Note II. *Gazzetta Chimica Italiana*, 90, 1449-1485.
- Patumi, M., Andria, R., Marsilio, V., Fontanazza, G., Morelli, G., Lanza, B. (2002). Olive and Olive Oil Quality After Intensive Monocone Olive Growing (*Olea europaea*, L., cv. Kalamata) in Different Irrigation Regimes. *Food Chemistry*, 77: 27-34.
- Pazır, F., Küçükyaşar, S., (2019). Organik ve Konvansiyonel Memecik Çeşidi Yeşil Zeytinler Arasındaki Fiziksel, Kimyasal ve Pomolojik Özellikler Açısından Farklılıklar, *Akademik Gıda* 17(1) (2019) 47-54, Araştırma Makalesi.
- Pereira, J.A., Pereira, A.P.G., Ferreira, I.C.F.R., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54(22):8425–31.
- Pirgun, N. (2007). Hatay’da Yetiştirilen Gemlik ve Halhalı Zeytinlerinin Antioksidan Etkilerinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi
- Prim, N. Pastor, F.I.J. Diaz, P. (2003). Biochemical studies on cloned *Bacillus* sp. BP-7 phenolic acid decarboxylase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 51–56.
- Raj Narayana, K., Sripal Reddy, M., Chaluvadi, M. R., Krishna, D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 2–16.
- Ramírez, E., García, P., Brenes, M., Romero, C. (2016). Evaluation of Chemical Components of Debittered Olives Undergone Preservation and Polyphenol Oxidation. *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 51, no. 7, pp. 1674– 1679.
- Ramos, A.M., Martins, E.M.F., Vanzela, E.S.L., Stringheta, P.C., Pinto, C.L.O., Martins, J.M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Res. Int.*, 51, 764–770.

- Randazzo, C. L., Restuccia, C., Romano, A. D., Caggia, C., (2004). *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90,9-14.
- Randazzo, C.L., Pino, A., Vaccalluzzo, A., Solieri, L., Romeo, F.V., Todaro, A., Caggia, C., Arroyo-Lopez, F.N., Bautista-Gallego, J. (2019). Effect of Sequential Inoculum of Beta-Glucosidase Positive and Probiotic Strains on Brine Fermentation to Obtain Low Salt Sicilian Table Olives. *Journal Frontiers in Microbiology* 10:174.
- Rapoport, H.F., Fabbri, A., Sebastiani, L., Olive biology, in *The Olive Tree Genome*, ed. by Rugini, E., Baldoni, L., Muleo, R., Sebastiani, L. (2016). Springer International Publishing, Gewerbestrasse, Switzerland.
- Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., ArroyoLópez, F.N. (2012). Multivariate analysis to discriminate yeast strains with technological applications in table olive processing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28, 1761–1770.
- Rodriguez, G., Lama, A., Rodriguez, R., Jimenes, A., Guillen, R., Fernandez- Bolonoz, J., (2007). Olive Stone an Attractive Source of Bioactive and Valuable Compounds. *Bioresource Technology*. Vol.99, Pp.5261-5269.
- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F., Cimato, A. (1999). Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 964–967.
- Romero-Segura, C., Sanz, C., Pérez, A. G. (2009). Purification and Characterization of an Olive Fruit β -glucosidase Involved in the Biosynthesis of Virgin Olive Oil Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7983-7988.
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., Garcia, P., Garcia, A., Garrido, A. (2004). Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, 479–484. (53).
- Rovellini, P., Cortesi, N. (2002). Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oil: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, LXXIX, 1–14.
- Rubia-Soria A, Abriouel H, Lucas R, Omar NB, Martinez-Canamero M, Galvez A. (2006). Production of antimicrobial substances by bacteria isolated from fermented table olives. *World J Microbiol Biotechnology*; 22:765-768.
- Russo, P., Caggianiello, G., Arena, M.P., Fiocco, D., Capozzi, V., Spano, G. (2017). Lactic Acid Bacteria of Fermented Fruits and Vegetables. In: *Lactic Acid Fermentation of Fruits and Vegetables*, Paramithiotis, S. CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton, pp. 19-36.

- Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P. D., Lavee, S., Robards, K. (2002). Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6716–6724.
- Ryan, D., Robards, K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123, 31R–44R. derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26, 762-769.
- Saari, N., Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K.M., Gilani, A. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) —A Review.
- 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 Science Biotechnology* 22:613–620.
- Sciancalepore, V., Longone, V. (1984). *Journal Of Agriculture And Food Chemistry* 32:320.
- Selli, S., Kelebek, H., Kesen, S., Sonmezdag, A.S. (2018). GC-MS olfactometric and LC-DAD-ESI-MS/MS Characterization of Key Odorants and Phenolic Compounds in Black Dry-Salted Olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2018; 98: 4104–4111
- Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Macchioni, A., Montedoro, G. (1999). High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters and pomace and 1D- and 2D-Nuclear Magnetic Resonance characterization. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76, 873–882.
- Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G.F. (2002). Volatile compounds and phenolic composition of virgin olive oil: Optimization of temperature and time of exposure of olive paste to air contact during the mechanical extraction process. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003, 51, 7980–7988.
- Sivakumar, G., Bati, C. B., Uccella, N. (2005). HPLC-MS Screeing of The Antioxidant Profile of Italian Olive Cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 588–591.
- Soler-Rivas, C., Espin, J. C., Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and Related Compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1013–1023.
- Tamendjari, A., Mettouchi, S., Sacchi, R., Ould Moussa, Z.E.D., Paduano, A., Savarese, M. (2016). Effect of Spanish style processing on the phenolic compounds and antioxidant activity of Algerian green table olives. *Grasas Aceites* 67 (1): e114.
- Tokatlı, M., Dursun, D., Arslankoz, N., Şanlıbaba, P., Özçelik, F. (2012). Turşu üretiminde laktik asit bakterilerinin önemi. *Akademik Gıda*, 10(1): 70-76.
- Tunalıoğlu, R., (2009). *Zeytincilik-Zeytinyağı Ekonomisi ve Politikalar*, Editörler: F. Göğüş, M.T. Özkaya ve S. Ötleş, Eflatun Yayınevi, Ank., s.211-242.
- TÜİK, UZZK (2018) Türkiye İstatistik Kurumu, Ulusal Zeytin ve Zeytinyağı Konseyi.
- Türkiye Cumhuriyeti Resmî Gazetesi, (2014). 29097 Sayılı Türk Gıda Kodeksi Sofralık Zeytin Tebliği (Tebliğ No: 2014/33). Resmî Gazete 23 Ağustos 2014.

- Uccella, N. (2001). Olive Biophenols: novel ethnic and technological approach. Trends Food Science Technology, 2001, 11, 328-339.
- Uylaşer, V. (2015). Changes in phenolic compounds during ripening in Gemlik variety olive fruits obtained from different locations, CyTA- Journal of Food, DOI: 10.1080/19476337.2014.931331
- 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. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 89, 561–568.
- Vlahov, G. (1992). Flavonoids in three olive (*Olea europea*) fruit varieties during maturation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 58, 157-159.
- Yıldız, G., Uylaşer, A. (2011). Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 25, 131-142.
- Yorulmaz, A., Tekin, A., (2008). Zeytin ve Zeytinyağı Fenolikleri. I. Ulusal Öğrenci Kongresi. 17-18 Mayıs, Balıkesir, s. 24-31.
- Zeytin, M. A., Arslan, D, Özcan, M., (2008). Domat, Edremit ve Gemlik Zeytin Çeřitlerinin Fizikokimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Özellikleri Üzerine Farklı İşleme Metodlarının Etkisi. 1.Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, 17-18 Mayıs 2008/ Edremit- Balıkesir.

ÖZGEÇMİŞ

06.12.1992 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta, lise ve üniversite öğrenimini Adana’ da tamamladım. 2011-2017 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitimi aldım. 2017 yılında Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım.

