

استفاده از لاکتوباسیل پلانتاروم به عنوان کشت آغازگر در پروسه تخمیر زیتون سبز با شرایط هوادهی

فرزانه سلامی^{1*}، حمید راشدی²، حکیمه مهدیان ناصر³

1- همپتراز هیئت علمی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران- پژوهشکده زیست فناوری

2- استادیار و عضو هیات علمی گروه مهندسی شیمی دانشکده فنی دانشگاه تهران

3- سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران- پژوهشکده زیست فناوری

(تاریخ دریافت: 89/6/23 تاریخ پذیرش: 89/7/22)

چکیده

4 لاکتوباسیلوس پلانتاروم، که از تخمیر طبیعی زیتون جدا شدند به عنوان استارتر کالچر در پروسه تخمیر طبیعی زیتون (زیتون سبز مانزانیلا) با شرایط هوادهی استفاده شدند. باکتریهای لاکتیکی از میکروارگانیسم های ضروری در تخمیر زیتون سبز هستند. تلقیح با استارتر کالچر باکتریهای لاکتیکی 5-7 روز بعد از قرار گرفتن زیتون در آب نمک میتواند پروسه تخمیر زیتون را استاندارد کند. این باکتریهای لاکتیکی از آب نمک در حین تخمیر طبیعی زیتون جدا شده اند که نسبت به سطح بالائی از اسید لاکتیک و استیک، سطح بالائی از نمک و 1٪ الیوروپین مقاوم هستند. تخمیر در 4 باریل (15 لیتری) مورد بررسی قرار گرفت. هر باریل 1, 2 با 7 کیلو زیتون که با 7 لیتر آب نمک 8٪ و 1/0٪ اسید استیک تیمار شدند و باریل 3 و 4 که هریک با 7 کیلو زیتون که با 7 لیتر آب نمک 6٪ و 3/0٪ اسید استیک تیمار شدند. در باریل های 2 و 4 در روز پنجم تخمیر تلقیح لاکتوباسیل پلانتاروم انجام گرفت. سپس برای هر باریل به وسیله ستون های هوادهی، شرایط هوادهی را برای 190 روز فراهم کردیم و در دمای 28 °C اینکوبه کردیم. تستهای فیزیکوشیمیائی زیتون در طی تخمیر شامل نمک، پروتئین، چربی، اسیدیته، درصد خاکستر و درصد رطوبت و در آب نمک زیتون شامل اسیدیته، نمک، قندها احیاء کننده و pH می گردید.

در این تحقیق، استفاده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم مناسب به عنوان استارتر کالچر، کنترل میکروبیولوژیکی پروسه تخمیر را بهبود می بخشد، افزایش تولید اسید لاکتیکی و متعاقباً افزایش اسیدیته در آب نمک زیتون را سبب می شود و تولید زیتون سبز تخمیری با کیفیت بالا وثابت را فراهم می کند. بنابر این استفاده از تلقیح باکتریهای لاکتیکی به عنوان یک تکنولوژی جدید میتواند در طی تخمیر زیتون به کار برده شود.

کلید واژگان: لاکتوباسیلوس پلانتاروم + باکتریهای لاکتیکی (LAB) + تخمیر زیتون

1- مقدمه

تلخی زدائی زیتون های رومیزی حتماً احتیاج به یک مرحله که به مدت 7 تا 12 ماه عمل تخمیر روی آنها صورت می گیرد.

آب نمک دارد که در طی آن زیتون ها تخمیر می شوند. در تلخی زدائی زیتون ها به روش اسپانیائی قبل از مرحله آب نمک، زیتون ها به وسیله سود تیمار می شوند. تلخی زدائی وقتی که زیتون ها به طور مستقیم و بدون هیچ تیماری در آب نمک قرار می گیرند بدین ترتیب توسط مخمرها و باکتریهای لاکتیک یا هر دو دسته تخمیر می شوند [1]. در پروسه تخمیر

* مسئول مکاتبات: farzaneh_salami@yahoo.com

طبیعی زیتون تجمع گازهای تنفسی زیتون ها یعنی CO₂ باعث

2- مواد و روش ها

این بررسی بر روی زیتون های واریته ما نزانایلا که به طور مستقیم در آب نمک (بدون تیمار سود) قرار می گیرند در 4 باریل (15 لیتری) مورد بررسی قرار گرفت. هر باریل 2,1 با 7 کیلو زیتون که با 7 لیتر آب نمک 8% و 0,1% اسید استیک تیمار شدند و باریل 3 و 4 که هریک با 7 کیلو زیتون که با 7 لیتر آب نمک 6% و 0,3% اسید استیک تیمار شدند. در باریل های 2 و 4 در روز پنجم تخمیر تلقیح لاکتوباسیل پلانتاروم انجام گرفت. باریل های غیر تلقیحی که به عنوان کنترل استفاده شدند یعنی بازتاب گونه هائی است که به طور طبیعی در تخمیر زیتون رشد می کنند. سپس برای هر باریل به وسیله ستون های هوادهی، شرایط هوادهی فراهم کردیم [3] و در دمای 28 قرار دادیم. شرایط فرمانتاسیون در طی 190 روز با تست های فیزیکوشیمیائی و میکروبی بر روی نمونه هائی که متناوباً برداشت می شد، گزارش شد [9,8,3].

سویه های باکتری و آماده سازی برای تلقیح: 4

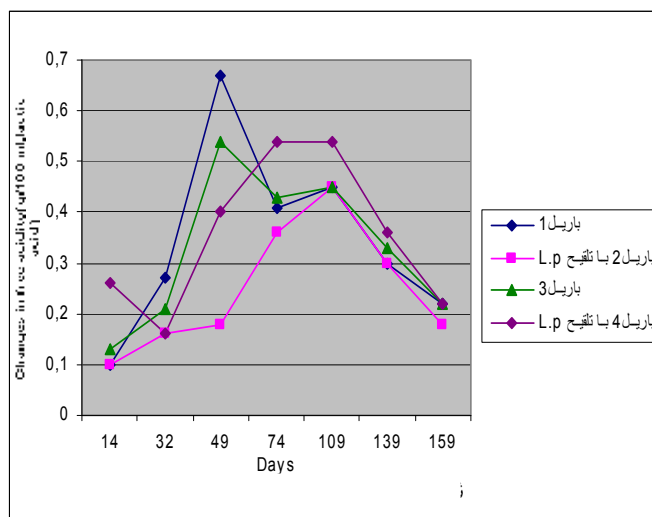
سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم که در این بررسی استفاده گردید، باکتریهای بی هستند که از آب نمک در حین تخمیر زیتون به روش طبیعی (بدون تیمار سود) جدا شده اند و نسبت به سطح بالائی از اسید لاکتیک و استیک، سطح بالائی از نمک و 1% الئوروپین مقاوم هستند و مورد شناسائی قرار گرفتند. سپس آنها در گلیسرول 20% (حجم/حجم) و محیط MRS در فریزر در 80°C- در کلکسیون میکروبی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران نگهداری شدند. برای تلقیح کشت میکروب در فاز لگاریتمی در MRS براث را سانتیفریژ (به مدت 20 دقیقه در 6000 دور) کرده سپس آنرا 2 بار در سالیین شسته و از آن رقت 0/5 مک فارلند تهیه گردید (2-1.5 of O.D.600). برای تلقیح از هر 4 سویه استفاده گردید و میزان تلقیح 4 سویه روی هم 1% انتخاب گردید یعنی از هر سویه 0/25% تلقیح گردید [10].

بررسی های فیزیکوشیمیائی آب نمک زیتون

وزیتون: تغییرات pH آب نمک هفته ای یکبار انجام گرفت

می تواند به طور مستقیم با نگهداری در آب نمک هم صورت گیرد چروک شدن و تشیکل چشم ماهی در آن می شود. خطر دیگر در پروسه تخمیر طبیعی زیتون رشد کردن باکتریهای گرم منفی و رشد بعضی از جنسهای مخمرهاست که سبب فساد و کاهش کیفیت محصول نهائی زیتون می شوند و ضایعاتی مثل نرم شدگی و چشم ماهی ایجاد می کنند [2]. در سال 1985، گارسیا گارسیا [3] این روش را اصلاح کرد. تغییر و اصلاح روش در دو جهت صورت گرفت. تصحیح pH اولیه پروسه به حدود 4، تا از رشد اولیه باکتری گرم منفی جلوگیری شود و ایجاد شرایط هوازی برای برطرف کردن تجمع CO₂ اضافی. به کارگیری این پروسه کیفیت نهائی زیتون ها را افزایش می دهد به شرطی که در تمام مرحله تخمیر شرایط هوازی حفظ شود. مانع دیگر در این پروسه آن است که تولید نشدن اسید و شرایط هوازی باعث بالا رفتن pH می شود به همین دلیل باید با اضافه کردن باکتریهای لاکتیکی، اسیدیته و pH کنترل و تنظیم شود [4]. لاکتوباسیلوس پلانتاروم به طور خود بخودی در تخمیر زیتون رشد می کند. افزایش این گونه باکتری در آب نمک منجر به ایجاد مقدار زیادی اسید لاکتیک می شود که برای حفظ و نگهداری زیتونها مورد نیاز می باشد. یک تا دو هفته بعد از قرار دادن زیتونها در آب نمک، لاکتوباسیل پلانتاروم ها افزایش می یابند و بر باکتریهای گرم منفی و بقیه باکتریهای لاکتیکی غلبه می یابند و عموماً همراه با جمعیت مخمرها تا پایان مراحل تخمیر وجود دارند. برای بدست آوردن یک محصول ثابت با بو و طعم تپیکال، رشد میکروارگانیسمها به ترتیب صحیح ضروری است [5]. مشابه بقیه تخمیرهای طبیعی گیاهی تولید زیتون های سبز وابسته به وجود میکروارگانیسمهایی است که فلور طبیعی تولید خام هستند و یا در محتویاتی که محصول در آن نگهداری می شود وجود دارند [5,6,7]. بنابر این کنترل مراحل تخمیر با اضافه کردن لاکتوباسیل پلانتاروم ها سبب جلوگیری از ضایعات می شود و محصولی با کیفیت بالا را فراهم می کند. به طور کلی می توان گفت در مورد تخمیر زیتون در ترکیه، اسپانیا و ایتالیا سالیان متعددی کار شده است و سابقه تحقیق در این روش در ترکیه و اسپانیا می باشد که به حدود 20 سال پیش می رسد ولی در ایران این روش برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت.

اسیدیته اندازه گیری شده از 0/1 تا 0/6 در صد نوسان داشت تفاوت در پروسه اسید سازی (acidification) در بین تیمارها مشاهده شد. که در تیمارهای تلقیح نشده 1 و 3 ماکزیمم اسیدیته در روز پنجاهم تخمیر بدلیل افزایش باکتریهای اسید لاکتیک و مصرف بالای قندها و تولید اسید لاکتیک نتیجتاً افزایش اسیدیته در این تاریخ مشاهده شد ولی در تیمارهای تلقیح شده 2 و 4 ماکزیمم اسیدیته در حدود روز هفتماد تخمیر مشاهده شد و این بدلیل این است که سوبه های تلقیح شده در این تیمارها ابتدا از رشد لاکتوباسیل‌های وحشی بویژه جمعیت کوسیه‌های اسید لاکتیک جلوگیری می کند و پس از آن به عنوان جمعیت غالب میکروارگانیسمهای تخمیری بعد از روز هفتماد تخمیر ثابت می شوند و تا انتهای تخمیر باقی می ماند. غلظت اسید لاکتیک نهایی در فرماتوره‌های تلقیحی با لاکتوباسیل پلاتاروم ها بالاترین میزان بود (شکل 1).



شکل 1 تغییرات اسیدیته در آب نمک در طی تخمیر

غلظت نمک در آب نمک تیمارها نوسان دارد در محدوده سطوح 4 تا 6٪ و در نهایت در باریل 1 و 2 به حدود 5٪ می رسد و در باریل 3 و 4 به حدود 4٪ می رسد. و غلظت نمک در سراسر تخمیر در تمام آب نمکهای تخمیری مشابه بود یعنی در باریل 2 و 1 در انتهای تخمیر به حدود 5٪ و در باریل 3 و 4 در انتهای تخمیر به حدود 4٪ رسید و در تیمارهای تلقیح شده و تلقیح نشده یکسان بود. تغییرات نمک در آب نمک نشان داد که نمک معمولاً در ابتدای تخمیر به دلیل مبادله یونها بین میوه و آب نمک که آن را احاطه کرده است کاهش پیدا می کند و بتدریج میزان نمک به یک تعادل ثابتی می رسد (شکل 2).

اندازه گیری نمک، آب نمک بر طبق روش استاندارد کنسرو زیتون سبز فرآیند شده شماره 987 اداره استاندارد ایران انجام شد [11]. اندازه گیری قند در آب نمک بر طبق روش رنگ سنجی با اسید دی نیترو سالسلیک (DNS) انجام شد [12]. اندازه گیری اسیدیته آب نمک بر طبق روش تیتراسیون (بر اساس استاندارد اندازه گیری اسیدیته مایع پوششی زیتون شماره 987) انجام گرفت [11].

اندازه گیری نمک زیتون بر طبق روش موهر، پروتئین زیتون بر طبق روش کلدال، چربی زیتون بر طبق روش سوکسله، اسیدیته زیتون بر طبق روش تیتراسنجی و درصد خاکستر و رطوبت زیتون بر طبق روش وزن سنجی بعد از حرارت دادن در کوره الکتریکی و آون معمولی انجام گرفت [12، 13].

بررسی های میکروبیولوژیکی

شمارش میکروارگانیسم ها روی یک محیط جامد انجام شد. رقت های هموزن از 10 میلی لیتر آب نمک در محلول سالین فیزیولوژیک همراه 1٪ توئین 80٪ آماده می شود، سپس رقت های 0/1، 0/01 و 0/001 روی 3 محیط برای جداسازی میکروارگانیسم ها کشت دادیم [14] که این 3 محیط عبارتند از:

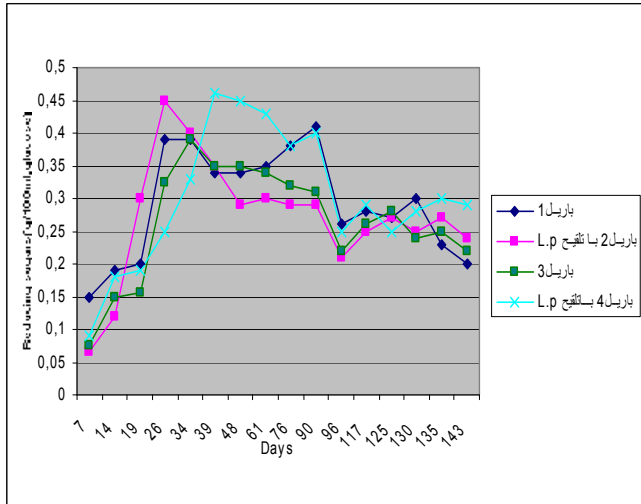
1- محیط ویولت ردبایل دکستروز آگار (Violet red bile - dextrose agar) برای جداسازی باکتریهای گرم منفی از آب نمک استفاده شد [15] و پلیت ها به مدت 24 ساعت در 37°C اینکوبه شدند.

2- محیط دکستروز یست اکسترکت آگار (Dextrose- yeast-extract-agar) با 0/01٪ اکسی تتراسیکلین برای جداسازی مخمرها استفاده شد [16] و پلیت ها به مدت 24 ساعت در 25°C اینکوبه شدند.

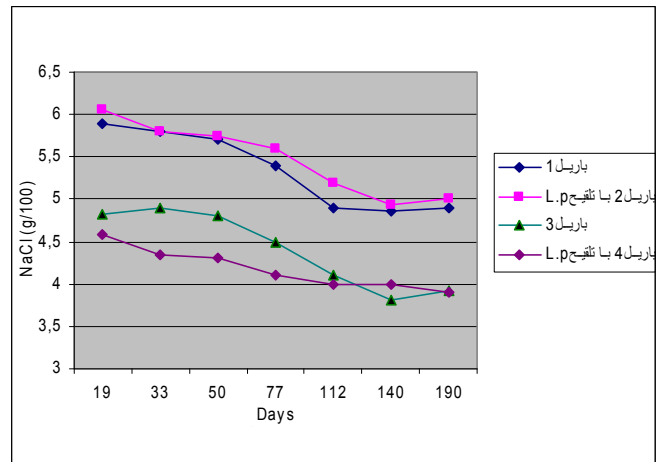
3- محیط ام.آر.اس آگار (MRS agar) به همراه 0/02٪ سدیم آزاید برای جداسازی باکتریهای لاکتیک استفاده شد [17] و پلیت ها به مدت 48 ساعت در 30°C اینکوبه شدند. تکنیک استاندارد پلیت برای شمارش میکروارگانیسم ها استفاده شد [18] و تعداد باکتریها بر اساس لگاریتم کلنی فورمینگ یونیت بر میلی لیتر (log cfu/ml) گزارش شد.

3- نتایج و بحث

گلوکز در آب نمک نشان داد که قندها به وسیله میکروارگانیسم ها استفاده می شوند پس میزان قندها در حین تخمیر کاهش پیدا می کند و بتدریج که پروسه تخمیر پیش می رود به دلیل کاهش قندها در آب نمک، طبیعتاً مصرف آنها هم کم خواهد شد (شکل 4).

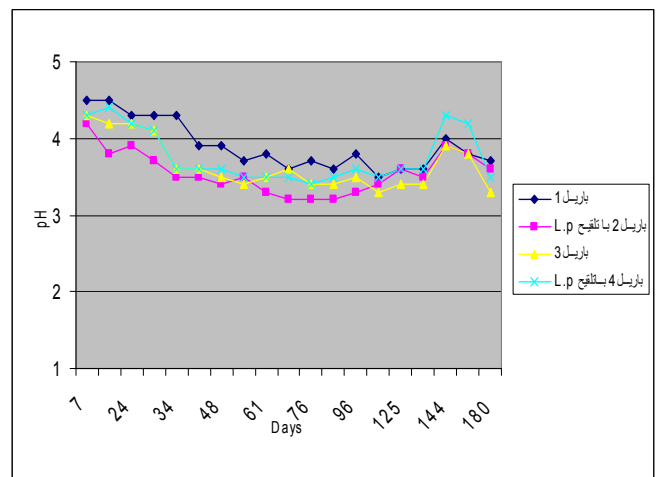


شکل 4 تغییرات مقادیر قند احیا کننده در آب نمک در طی تخمیر ترکیب شیمیائی زیتون مانزانیلا قبل از تخمیر در جدول 1 نشان داده شده است. همچنین ترکیبات شیمیائی زیتون مانزانیلا در انتهای تخمیر تحت عنوان نمونه 1 (زیتون باریل 1 با 8٪ نمک) و نمونه 2 (زیتون باریل 2 با 8٪ نمک و تلقیح لاکتوباسیل پلانتراروم) نمونه 3 (زیتون باریل 3 با 6٪ نمک) و نمونه 4 (زیتون باریل 4 با 6٪ نمک و تلقیح لاکتوباسیل پلانتراروم) در جدول 2 نشان داده شده است. همانطور که در جداول 1 و 2 مشاهده می شود مقدار پروتئین زیتون در انتهای تخمیر تقریباً "در حدود 0/2٪ افزایش پیدا کرده است. درصد چربی زیتون تقریباً "در حدود 2٪ کاهش پیدا کرده است. اسیدیته تقریباً "در حدود 0/02٪ افزایش پیدا کرده است و درصد رطوبت تقریباً "در حدود 5-2٪ افزایش پیدا کرده است و درصد خاکستر تقریباً "در حدود 5-4٪ افزایش پیدا کرده است و درصد نمک 4-3٪ افزایش پیدا کرده است. باید توضیح داد که این تغییرات ترکیبات شیمیائی زیتون بعد از تخمیر به دلیل تخمیر حساس و دقیقی است که در طی آن تبدیل قندها به متابولیت



شکل 2 تغییرات مقدار نمک در آب نمک در طی تخمیر

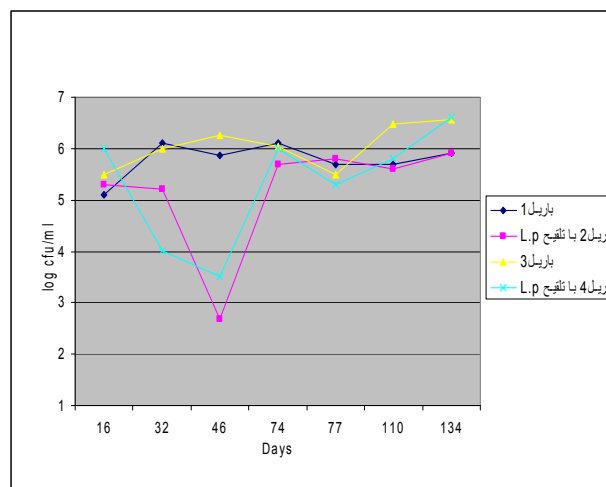
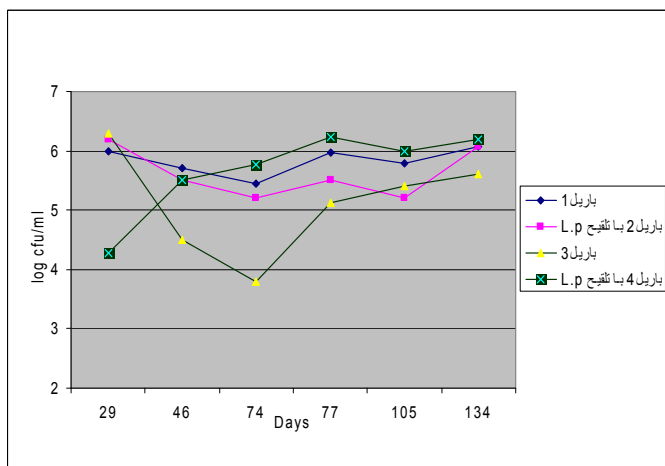
پارامترهای فیزیکی و شیمیایی در آب نمک های زیتون، یک کاهش مشابه در pH در سراسر تخمیر در آب نمکهای تلقیح شده و نشده و رسیدن به حدود 3/6 در پایان پروسه مشاهده شد (شکل 3).



شکل 3 تغییرات PH در آب نمک در طی تخمیر

همچنین تعادل بین آزاد شدن گلوکز از میوها به آب نمک و استفاده از آن بوسیله میکروفلوورهای که مشابه بودند در نمونه ها مشاهده شد و غلظت نهایی گلوکز در نهایت به 0/13 درصد در باریل های 1 و 2 و در باریل های 3 و 4 به 0/11 درصد رسید که در تیمارهای تلقیح شده و نشده تقریباً مشابه بود. تغییرات

همانطور که در شکل 6 مشاهده می شود نمودار رشد مخمرها در تمام باریل های 1، 2، 3 و 4 در طول تخمیر دیده شده است و مقدار آنها بالای $3 \log \text{CFU/ml}$ در طول تخمیر بوده است هیچ تفاوت معنا داری بین تیمارهای تلقیحی و تیمارهای غیر تلقیحی دیده نشد. و به طور کلی می توان گفت مخمرها به همراه باکتریهای اسید لاکتیک در تمام طول تخمیر دیده می شوند همچون نتیجه ای که گارسیا گارسیا¹ و دوران² در سال 1992 گرفتند [19].



شکل 5 تغییرات شمارش باکتریهای لاکتیک در آب نمک در طی تخمیر

همانطور که نمودارها نشان می دهد ماکزیمم رشد باکتریهای لاکتیک در باریل های 1 و 3 حدوداً از روز 40 تخمیر شروع می شود و ماکزیمم رشد حدود روز پنجاهم تخمیر می باشد یعنی زمانی که تخمیر به طور فعال صورت می گیرد و از این تاریخ به بعد به تدریج تعداد آنها کاهش می یابد. ولی در باریل های 2 و 4 به دلیل تلقیح لاکتو باسیل پلانتاروم، در روز پنجاهم تخمیر یک کاهش چشمگیری در تعداد باکتریهای لاکتیک مشاهده میکنیم که این به دلیل این است که سویه های تلقیح شده در این تیمارها ابتدا از رشد لاکتوباسیل های وحشی بویژه جمعیت کوکسیهای اسید لاکتیک جلوگیری میکند و پس از آن به عنوان جمعیت غالب میکروارگانیسم های تخمیری بعد از روز هفتم تخمیر ثابت می شوند و تا انتهای تخمیر باقی می مانند.

| | |
|----------------|-----|
| پروتئین (%w/w) | 3/4 |
|----------------|-----|

| | |
|-------------|------|
| چربی (%w/w) | 15/5 |
|-------------|------|

| | |
|----------------|------|
| اسیدیته (%w/w) | 0/08 |
|----------------|------|

| | |
|-------------------|-------|
| درصد رطوبت (%w/w) | 67/96 |
|-------------------|-------|

| | |
|--------------------|------|
| درصد خاکستر (%w/w) | 1/13 |
|--------------------|------|

| | |
|------------|------|
| نمک (%w/w) | 0/05 |
|------------|------|

شکل 6 تغییرات شمارش مخمرها در آب نمک در طی تخمیر

جدول 1 ترکیب شیمیائی زیتون مانزانیلا قبل از تخمیر

1. Garcia Garcia
2. Duran

تخمیر زیتون، استفاده از فقط یک گونه برای تولید زیتون رومیزی با کیفیت مطلوب مناسب نیست. به خصوص در زیتون های سبز، یک جمعیت مخلوط باکتری های اسید لاکتیک را نیاز داریم تا استاندارد خواسته شده را بدست آوریم. در تفسیر نتایج این تحقیق باید گفت که مخمرها در تمام طول پروسه تخمیر مشاهده گردیدند و باید گفت وجود مخمرها در طول تخمیر زیتون های سبز، در ابتدایی ترین مطالعات این محصول در سال 1965 توسط گنزالس کنچو گزارش شده بود [16].

در تمام طول تخمیر وجود مخمرها مشاهده شد و جمعیت آنها بین 4-6 LogCFU/ml مشاهده گردید. همچون نتیجه ای که گارید و فرناندز در سال 1997 گزارش داد یعنی تخمیر توسط باکتری های لاکتیک انجام می شود ولی مخمرها در طی پروسه وجود دارند و جمعیت آنها بین 4-6 LogCFU/ml می باشد.

باید توضیح داد در طی تخمیر زیتون مسئله مهم این است که رشد مخمرها از 7 LogCFU/ml بالاتر نرود زیرا همانطور که در سال 1985 فرناندز توضیح داد اگر در طی تخمیر زیتون ها تعداد مخمر از 7 LogCFU/ml بیشتر شود می تواند باعث تولید شدید CO₂ شود که ممکن است به زیتون ها نفوذ کند و میوه ها را خراب کند. در این بررسی نیز همواره رشد مخمرها زیر 7 LogCFU/ml بوده است که سلامت زیتون ها را در طی تخمیر تضمین می کند.

به طور کلی باید در تفسیر نتایج گفت در سال 1979 دوران کویتانا گزارش داد تخمیر لاکتیکی در زیتون هائی که به طور مستقیم در آب نمک قرار می گیرند به ندرت دیده می شود [9]. ولی در سال 1985 گارسیا گارسیا گزارش داد اگر شرایط فیزیوشیمیائی مناسب برای زیتون هائی که به طور مستقیم در آب نمک قرار می دهیم فراهم باشد، در آنها هم می توانیم تخمیر لاکتیکی مشاهده کنیم که یکی از مهمترین این شرایط پائین آوردن pH با اسید استیک و همچنین برقرار کردن شرایط هوادهی می باشد [3]. نتایج این تحقیق هم نشان داد که تخمیر لاکتیکی در تخمیر طبیعی زیتون ها (بدون تیمار سود) با فراهم کردن شرایط فیزیوشیمیائی مناسب اتفاق می افتد. همچنین اضافه کردن لاکتوباسیلوس پلانناروم در روز پنجم تخمیر باعث می شود توتال اسیدیته در طول تخمیر بالا رفته و pH در

| ترکیبات شیمیائی | نمونه 1 | نمونه 2 | نمونه 3 | نمونه 4 |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|
| شیمیائی | 3/6 | 3/4 | 3/4 | 3/5 |
| پروتئین | -14/98 | -14/3 | -14/5 | -15 |
| چربی | 13/5 | 13/8 | 14 | 13/5 |
| اسیدیته | -0/19 | 0/18 | 0/1 | 0/17 |
| رطوبت | -70/6 | -70/6 | -73/96 | -74/53 |
| خاکستر | 69/1 | 69/8 | 72/1 | 73/4 |
| نمک | 6/1-6/3 | -6/6 | 5/5-5/7 | 5/42 |
| | 4/2-4/3 | -4/3 | 3/2-3/4 | 3/2-3/5 |
| | | 4/1 | | |

جدول 2 ترکیب شیمیائی زیتون مانزانیلا در انتهای تخمیر

در مورد شمارش باکتریهای گرم منفی باید توضیح داد که پس از کشت آب نمک باریل های 1، 2، 3 و 4 بر روی محیط ویولت رد بایل دکستروز آگار² پس از 24 ساعت هیچ رشدی مشاهده نشد ولی بعد از 48 ساعت رشد کمی از خود نشان دادند ولی مقالات رشد 24 ساعته را برای شمردن باکتریهای گرم منفی ذکر کردند و فقط رشد آنها را در ابتدای تخمیر اندک ذکر کردند. پس در مورد رشد باکتریهای گرم منفی در کشت 24 ساعته بعد از 20 روز از شروع تخمیر که نمونه برداری ما انجام شد، هیچ رشدی دیده نشد ولی در کشت 48 ساعته رشد باکتریهای گرم منفی را به مقدار خیلی کمتر از باکتریهای اسید لاکتیک و مخمرها مشاهده کردیم.

به عبارت دیگر در این تحقیق تلقیح استارترکالچر کنترل میکروبیولوژی عملکرد آن در تخمیر زیتون بهینه سازی صورت پذیرفت. تحقیق در مورد پیدا کردن بهترین گونه استارتر هنوز در دنیا در دست مطالعه و بررسی می باشد. ولی به طور روشنی باید ذکر کرد که با وجود نقش اساسی باکتری های لاکتیکی در

- [9] Duran Quintana, Gonzalez Cancho, 1979, Aceitunas negras al natural en salmuera. IX Ensayos de produccion de 'alambrado' por incubacion de diversos microorganismos
- aislados de salmueras de fermentacion, Grasa y Accites 30, 361-367.
- [10] Vega Leal-Sanchez M. , Ruiz-Barba.J.L. ,Sanchez A.H.Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture, Journal of Food Microbiology 20(2003)421-430.
- [11] Institute of standards & Industrial research of Iran,1371, Processed olive Specifications and test methods,number 987(17,18,19).
- [12] Majadi ,Mohsen ,1373,chemical analysis of food (140-141)(161-169)(223-227).
- [13] Pearson, Daivid. (1981), Chemical analysis of foods. (11-13,15-22).
- [14] Guner Ozay & Mehlika Borcakli, 1996. Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally balck olive. Food Research International. Vol 28, No.6. pp. 553-559.
- [15] ICMSF, 1983. Microorganismos de los alimentos. Volumen 1. tecnicas de analisis microbiologica. Zaragoza : Editorial Acribia, Spain.
- [16] Gonzalez Cancho, F. 1956. Poblacion microbiana de las salmueras de aceitunas. Grasas y Acetes 7, 81-88.
- [17] Harrigan & Mccance, 1979. Culture media composition. In laboratory methods in microbiology, pp. 46-54. Leon : Editorial Academic, Spain.
- [18] Anon. 1983, International commission on microbiological specifications for food (ICMSF) tecnicas de analisis. Microbiologicos. Vol.I.Zaragoza, Spain : Acribia.
- [19] P.Garcia Garcia, M.Duran, 1992. Lactic fermentation during the storage of alorena cultivar untreated green table olives. Journal of Applied Bacteriology 73. 324-336.
- [20] - Duran,M.C.,Garcia,P.,1993. Induced lactic acid fermentation during the preservation stage of ripe olives from طول تخمیر کنترل شود. همچون نتایجی که دوران کوینتانا و گارسیا در سال 1993 گرفتند [20].
- با تلقیح سویه های آنالیز شده لاکتوباسیل پلانتروم در پروسه تخمیر به عنوان استارتر، پروسه فرآوری زیتون استاندارد شده بنابراین کنترل مراحل تخمیر با اضافه کردن لاکتوباسیل پلانتروم ها سبب جلوگیری از ضایعات می شود و محصولی با کیفیت بالا را فراهم می کند. هیچ ضایعه ایی در زیتونها مشاهده نشد از نظر بافت و مزه تیمارهایی که با لاکتوباسیلها فرآوری شده بودند به طور معنا داری از بقیه تیمارهایی که بدون تلقیح لاکتوباسیل ها تیمار شده بودند بهتر بودند.

4- منابع

- [1] V.Marsilio, B.Lanza and N.Pozzi. 1996. Progress in table olive debittering. JAOCS. Vol.73. No. 5(593-597).
- [2] Garrido Fernandez, A., Duran Quintana (1979). Aceitunas negras al natural en salmuera. Grasas y Aceites 30, 301-307..
- [3] Garcia Garcia, P., Dura Quintana (1985). Fermentacion de aceitunas negras maduras en salmuera. Grasas y Aceites 36, 14-20.
- [4] M.C.Duran, P.Garcia, 1993. Induced lactic acid fermentation during the preservation stage of ripe olives from Hojiblanca cultivar, Journal of Applied Bacteriology 1994. 76, 377-382.
- [5] Fernandez Diez,M.J.1983.Olives,p.379-397. In G. Reed(ed.),Food and feed production with microorganusms. Verlag Chemie, Deerfield Beach,Fla.
- [6] Vaughn, R. H. 1954. Lactic acid fermentation of cucumbers, sauerkraut and olives, p. 417-478. In L.A. Underkofler and R. J. Hickey (ed), Industrial fermentations, vol. 2. Chemical Publishing Co.,Inc., New York.
- [7] Vaughn, R. H., H. C. Douglas, and R.Gililland. 1943. Production of Spanish type green olives. Calif. Agric. Exp. Stn. Bull. 678.
- [8] Bobillo, Mercedes and Marshall, Valerie, 1991. Effect of salt and culture aeration on lactate and acetate production by *lactobacillus plantarum*. Food Microbiology, 8, 153-160.

Hojiblanca cultivar, Journal of Applied Bacteriology 1994. 76, 377-382.

Use of *Lactobacillus plantarum* starter culture during green olive fermentation processing with aerated condition

Salami, F. ^{1*}, Rashedi, M. ², Mahdian Naser, M. ³

1. M.Sc. in Microbiology and Biotechnology, Iranian Research Organization of Science & Technology

2. Assistant professor of department of chemistry science, Tehran university

3. M.Sc. in Microbiology and Biotechnology, Iranian Research Organization of Science & Technology

(Received: 89/6/23 Accepted: 89/7/22)

4 *Lactobacillus plantarum*, strains isolated from natural olive fermentation, was used as a starter culture for aerated olive (Manzanilla green olive) fermentation.

Lactic acid bacteria are essential microorganisms in green olive fermentation. Inoculation with a starter culture of *Lactobacillus plantarum* 5 – 7 days after brining could standardize olive processing. This *Lactobacillus plantarum* must be isolated from olive fermentation that is tolerated to high levels of lactic and acetic acids and high level NaCl concentration and also oleuropein 1%.

Fermentation took place in 4 glass barrels (15 L) with 7 kg of olives and 7 L of brine. Barrel 1, barrel 2 that were treated with 8% salt and 0.1% acetic acid. Barrel 3, barrel 4 that were treated with 6% salt and 0.3% acetic acid. Inoculation took place in 5 days after brining for barrel 2, 4. Aerated condition for barrels were supplied with aeration column for approximately 190 days and incubated in 28°C. The samples (olives and brines) were taken at different fermentation phases. Physical and chemical analyses of olive during the fermentation were including salt, protein, fat, acidity, moisture, ash and in brine olive were including acidity, salt, reducing sugar, pH.

In this research, the use of suitable *Lactobacillus plantarum* starter cultures has the potential to improve the microbiological control of process, increase the lactic acid yield and, accordingly, increasing acidity in brine olive and provide the production of natural fermented green olives of consistently high quality. Thus use of inoculation lactic acid bacteria can be applied as a new technology during the olive fermentation.

Key word: *Lactobacillus plantarum*, *Lactic acid bacteria*, olive fermentation

* Corresponding Author E-Mail address: farzaneh_salami@yahoo.com