

بررسی تغییر کمی و کیفی اسیدهای آلی طی فرایند کنسرو زیتون، به وسیله روش کروماتوگرافی با کارایی بالا

صمد صبوری هلمستانی^۱، شهرام دخانی^۲، غلامحسین کبیر^۳ و رضا شکرانی^۳

چکیده

چهار رقم زیتون کالاماتا، ماری، زرد و فیسمی از شهرستان رودبار تهیه شد. این ارقام با دو روش تخمیر طبیعی و تخمیر هدایت شده با کشت استارتر *Lactobacillus plantarum* در دمای ۲۵°C به مدت ۱۰۰ روز فرایند شدند و خصوصیات فیزیکیوشیمیایی محصول اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری اسیدهای آلی با روش HPLC انجام گرفت.

بیشترین اسیدیته کل برحسب اسیدلاکتیک، ۱/۰۸٪ (حجم / وزن) در رقم فیسمی تولید شد. به طور متوسط تولید اسیدیته کل در تخمیر طبیعی و در تخمیر هدایت شده به ترتیب در حدود ۱/۱-۰/۸ و ۰/۷-۰/۹ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر محلول در برگیرنده زیتون‌ها بود. بررسی وضعیت اسیدهای آلی موجود در ارقام زیتون، به وسیله روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، نشان داد که در طی فرایند تخمیر، مقدار دو اسید آلی لاکتیک و استیک در زیتون‌ها اضافه شد، ولی از مقدار اسیدمالیک و اسیدسیتریک کم گردید. بیشترین اسیدلاکتیک در رقم زرد (۱/۱٪) تولید شده است. نوع تخمیر در تولید اسیدلاکتیک تفاوتی ایجاد نکرد. بیشترین اسیداستیک در رقم زرد و ماری تولید شد، و نیز در تخمیر هدایت شده اسیداستیک بیشتری تولید گردید. دو اسید آلی مالیک و سیتریک طی ۵۰ روز اولیه فرایند ناپدید شدند. تغییر اسیدسیتریک در تخمیر هدایت شده زودتر انجام گرفت ولی تغییر اسید مالیک به نوع تخمیر بستگی نداشت.

واژه‌های کلیدی: زیتون، اسیدآلی، تخمیر طبیعی، تخمیر اجباری، HPLC

مقدمه

زیتون یکی از میوه‌های مناطق نیمه گرمسیری است که با داشتن ترکیبی ویژه، مصارف متنوع و زیادی در تغذیه انسان دارد. طبق برنامه‌های وزارت کشاورزی، بعد از سال دهم طرح طوبی هر سال معادل ۱/۸۰۰/۰۰۰ تن میوه زیتون تولید خواهد شد، که ۲۰ درصد (حدود ۳۶۰ هزار تن) این مقدار را زیتون کنسروی تشکیل می‌دهد (۳).

۱. کارشناس ارشد صنایع غذایی موسسه تحقیقات برنج کشور، رشت
۲. دانشیار صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۳. استادیار صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

است. نتایج حاصله نشان می‌دهد که در هر ۱۰۰ گرم میوه زیتون تولید داخلی به طور متوسط ۶۰ گرم آب، ۲۰ گرم چربی، ۱۰ گرم مواد قندی، ۱ گرم پروتئین و ۰/۳ گرم املاح وجود دارد (۴).

این میوه دارای گلوکز، پکتین، مواد معدنی نظیر آهن و پتاسیم، و ویتامین‌های A، B و C می‌باشد. در این حالت مقدار آب و روغن میوه‌ها حدود ۸۵-۹۰ درصد وزن گوشت میوه را تشکیل می‌دهد. اسیدهای آلی مانند سیتریک، مالیک، اگزالیک، فوماریک، تارتاریک، لاکتیک، استیک و هم چنین اسیدهای تری‌کربوکسیلیک، در گوشت میوه زیتون شناسایی و اندازه‌گیری شده است (۱۸). تجزیه شیمیایی مواد معدنی گوشت زیتون برای ارقام اروپایی انجام شده است. هم‌چنین، کربتساکس (۱۷) نشان داد که در گوشت میوه مقدار کمی مواد پروتئینی، سایر ترکیبات نیتروژنی، پکتین‌ها، ترکیبات عطری و طعمی و سایر مواد کمیاب وجود دارد.

یکی از فراورده‌های زیتون نوع تخمیری آن است. در فرایند تخمیر، به دلیل رشد و فعالیت میکروفلور طبیعی زیتون، خصوصیات عطری و طعمی جدیدی حاصل می‌گردد، که با تغییر بیوشیمیایی ویژه، تولید مواد مولد عطر و طعم می‌شود. در اکثر تخمیرهای لاکتیکی که به طور یک‌نواخت انجام می‌گردد، شاخص مهم تولید اسید لاکتیک است. ولی در تخمیرهای غیریک‌نواخت، علاوه بر اسید لاکتیک، اسیدهای آلی دیگر مانند اسید استیک، و نیز مواد جانبی تولید می‌شود، و برخی از عوامل رو به کاهش می‌نهند (۱۰).

روش‌های مختلفی برای نگهداری زیتون و تهیه کنسرو آن در کشورهای تولیدکننده زیتون معمول است. فرایند تخمیر به دو دسته تقسیم می‌شود: فرایند تخمیر کنترل شده و فرایند تخمیر طبیعی. فرایند تخمیر طبیعی طوری است که شرایط را برای رشد میکروارگانیسم‌ها آماده نموده، تولید اسیدیته مطلوب می‌کند. فرایند تخمیر کنترل شده به این صورت است که پس از فرایند حرارتی اولیه، با تغییر در فلور میکروبی زیتون، بار میکروبی آن را کم می‌کنند. سپس با تلقیح استارتر خاص مورد نظر، و آماده سازی محیط برای رشد این کشت، و با ایجاد

برای تولید کنسرو زیتون روش‌های متنوعی وجود دارد، که طی این فرایندها تغییر عمده و مهمی در ترکیب محصول به وجود می‌آید. تغییر به وجود آمده در اسیدهای آلی میوه زیتون، تأثیر زیادی در کیفیت محصول، و نیز روند فرایند دارد (۱). میوه زیتون شامل سه قسمت پوست، گوشت و هسته بوده که به ترتیب ۱/۵-۳/۵، ۶۶-۸۵ و ۱۳-۳۰ درصد وزن کل میوه را تشکیل می‌دهند (۱۷). ارقام مهم و شناخته شده زیتون در ایران بر حسب درصد تولید عبارتند از: زیتون سیاه ۵۰ درصد، زیتون زرد ۲۷ درصد، زیتون سبز ۱۴ درصد، زیتون گرد ۶ درصد، زیتون ماری ۲/۵ درصد و زیتون فیشمی ۰/۵ درصد. از بین اینها ارقام سیاه و سبز فقط برای روغن‌کشی، ارقام ماری و فیشمی برای کنسرو سازی و ارقام زرد و گرد، هم برای تهیه کنسرو و هم برای روغن‌کشی استفاده می‌شوند (۴).

وقتی میوه می‌رسد ممکن است وزن آن از ۲ تا ۱۲ گرم تغییر کند. در طول دوره رسیدن میوه زیتون، که در نیم کره شمالی از اوایل خرداد ماه شروع شده و تا آذر ماه ادامه پیدا می‌کند، وزن میوه مرتباً زیاد می‌گردد و تغییراتی در ترکیب شیمیایی آن نیز به وجود می‌آید. طبق تحقیقات فرناندز دایز (۱۴) بر روی زیتون رقم گوردل، معلوم گردید که اجزای تشکیل دهنده میوه به ترتیب زیر تغییر می‌کند: مقدار روغن خام به طور پیوسته افزایش پیدا می‌کند؛ مقدار قندهای احیا کننده بعد از یک افزایش سریع در ابتدا، تا مرحله رسیدگی کامل کاهش پیدا می‌کند؛ مقدار فیبر خام در ابتدا به سرعت کاهش می‌یابد و سپس از سرعت آن کاسته می‌شود؛ مقدار پروتئین‌های میوه ($N \times 6/25$) در طول دوره رسیدن در سطح پایین باقی می‌ماند و مقدار خاکستر نیز طی این مدت تغییر محسوسی نمی‌کند. بر پایه پژوهش کربتساکس و مارکاکس (۱۸)، متوسط ترکیب شیمیایی زیتون، حاصل از بررسی چهار هزار نمونه از شش کشور اروپایی و آفریقایی، به شرح زیر است: آب ۵۰ درصد، روغن ۲۰ درصد، قندها ۱۹/۱ درصد، سلولز ۵/۸ درصد، پروتئین ۱/۶ درصد و خاکستر ۱/۵ درصد.

یک چنین بررسی‌هایی در مورد زیتون‌های ایرانی نیز صورت گرفته

کالاماتا: این رقم یک زیتون اصلاح شده است، میوه‌های آن درشت و گوشتی است و برای کنسروسازی به کار می‌رود.

ماری: این رقم از قدیم در ایران کشت می‌شده، و ارقام اصلاح شده آن نیز تهیه شده است. میوه‌های آن کشیده و بلند است و عمق گوشت میوه‌های آن کم و چسبندگی گوشت به هسته کم است. این رقم زودرس بوده و جزو اولین میوه‌هایی است که وارد بازار می‌شود (۲).

زرد: این رقم بومی ایران است. شکل میوه به صورت قلبی است که کمی کشیده می‌باشد. عمق گوشت و اندازه آن متوسط است. رقم فیشرمی: این رقم بومی ایران است. میوه‌های گرد و تخم‌مرغی شکل تقریباً بزرگی دارد. هسته آن نیز گرد و بزرگ است. وزن میوه‌های آن زیاد بوده ولی میزان گوشت آن کم است. گوشت آن محکم به دیواره چسبیده است.

دستگاه‌های مورد استفاده عبارت بود از: دستگاه‌های خط تولید کنسرو موجود در کارگاه صنایع غذایی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ساخت شرکت شیمادزو ژاپن (شامل سه پمپ با توان تولید فشار بالا و مدل پمپ LC-6A، گرم‌خانه برای فراهم آوردن دمای خاص و کنترل دمای ستون، شناساگر اسپکتروفتومتری در طول موج ماورای بنفش، کنترل کننده سیستم، مجموع کروماتوپک شامل چاپگر، قسمت نرم‌افزاری و مانیتور، ستون اندازه‌گیری اسیدهای آلی و محل تزریق نمونه با لوپ به ظرفیت حداکثر ۲۰ میکرولیتر، دستگاه آب مقطرگیری و دستگاه سانتریفوژ ۶۰۰۰ دور در دقیقه مدل هتیج آلمان.

مواد مورد استفاده شامل استانداردهای اسیدهای آلی با خلوص بیش از ۹۹٪ محصول مرک آلمان، سود سوزآور و رزین تعویض آنیون از کارخانه مرک آلمان بود.

تولید کنسرو

ابتدا میوه‌های صدمه دیده، پوسیده و خراب، برگ‌ها و دم میوه‌های زیتون جدا و میوه‌ها از نظر اندازه درجه‌بندی گردیدند.

اسیدیته لازم، شرایط را برای تولید طعم و مزه و نیز نگهداری زیتون فراهم می‌نمایند (۱۵).

بویلو و مارشال (۶) پیشنهاد کردند برای تولید یک محصول مطلوب از زیتون سیاه رسیده شرایط هوایی به کار برده شود، که در این حالت جلوی رشد مخمرها گرفته شده و دی اکسید کربن تولید نمی‌گردد. هم چنین، با رساندن pH به حدود ۴-۴/۲ با استفاده از اسید استیک گلاسیال، جلوی رشد باکتری‌های گرم منفی گرفته می‌شود، و نیز استفاده از ۵-۶ درصد نمک طعام علاوه بر جلوگیری از تولید حفره گاز، از چروکیدگی زیتون ممانعت می‌کند.

طبق تحقیقات انجام شده (۱۰) معلوم گردیده که بهترین روش برای تولید زیتون تخمیر شده، قرار دادن زیتون‌ها بعد از یک شست شوی اولیه در آب لوله‌کشی است که pH آن به وسیله اسید استیک به ۴-۴/۲ رسیده باشد. سپس بعد از ۵-۷ روز، با کشتی از لاکتوباسیلوس پلانتروم^۱ تلقیح گردیده، و در خاتمه به آن نمک اضافه گردد، به طوری که غلظت نمک محلول در هر روز یک درصد افزایش یابد تا این که غلظت آن به ۵/۵-۶/۵ درصد برسد. این غلظت تا آخر تخمیر لاکتیک ثابت نگهداشته می‌شود. وقتی تخمیر به طور غیرفعال درآمد، مقدار نمک به هشت درصد افزایش داده می‌شود تا از فاسد شدن محصول در انبار جلوگیری گردد.

استفاده از کشت‌های خالص باکتری‌های لاکتیک اولین بار توسط گرواس در سال ۱۹۳۷ پیشنهاد شد، و سپس در سال ۱۹۴۳ به وسیله ووگن اصلاحاتی در آن انجام گرفت (به نقل از ۱۷). در حال حاضر این روش یکی از روش‌های تهیه زیتون تخمیر شده به طور هدایت شده می‌باشد. در طول تخمیر، قندهای احیا کننده توسط میکروارگانیسم‌ها مصرف شده، تبدیل به اسید می‌گردند (۱۷).

مواد و روش‌ها

زیتون‌های مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از:

1. *Lactobacillus plantarum*
2. High Performance Liquid Chromatography

به کار برده شد. زیتون‌ها تلخی زدایی شده، کنترل pH محلول در برگ‌برنده زیتون‌ها و نیز pH گوشت زیتون‌ها انجام، و پس از حصول اطمینان از این که pH آنها در محدوده مطلوب قرار دارد ($6-7 = \text{pH}$)، ابتدا زیتون‌ها در آب جوش به مدت سه دقیقه قرار گرفته، سپس در آب جوشیده سرد شده، خنک گردیدند. آن گاه در داخل شیشه‌های ۴۰۰ گرمی پر شدند. از طرف دیگر، کشت لاکتوباسیلوس پلاتناروم به تعداد تقریباً ۱۰۰۰ یاخته زنده در هر میلی متر مکعب در یک ارلن آماده شد. محتویات این ارلن در واقع کشت مادری بود که چهار رقم زیتون مورد آزمایش با آن تلقیح شدند. در ادامه عمل، محلول آب نمک استریل هشت درصد تهیه، و پس از افزودن محتویات ارلن کشت مادر به ۱۰۰ لیتر محلول مذکور، آب نمک تلقیح شده اصلی به دست آمد. سپس شیشه‌های حاوی زیتون با این محلول پر شده، پس از عبور از تونل هواگیری و درب‌بندی غیرقابل نفوذ، عملاً شرایط بی‌هوازی برای نشو و نمای لاکتوباسیلوس پلاتناروم آماده، و این شیشه‌ها نیز برای انجام عمل تخمیر به اتاق تخمیر با دمای 25°C منتقل شدند. روند تخمیر با گذشت زمان، با نمونه‌برداری و انجام آزمایش‌های لازم بر روی این نمونه‌ها دنبال و کنترل گردید.

اندازه‌گیری اسیدیته کل محلول دربرگیرنده زیتون برای این آزمایش اسیدیته ۱۰ میلی لیتر از محلول دربرگیرنده، با محلول ۰/۰۱ نرمال سود سوزآور استاندارد، در حضور معرف بروموتیمول بلو ارزیابی شد.

اندازه‌گیری اسیدهای آلی زیتون با دستگاه HPLC اندازه‌گیری اسیدهای آلی در چند مرحله انجام شد: آماده سازی فاز متحرک: فاز متحرک برای اندازه‌گیری و ارزیابی اسیدهای آلی موجود در نمونه، محلول رقیق اسید سولفوریک با $\text{pH} = 2/1$ بود. این آب از صافی‌های تحت خلأ ۴/۵ میکرون عبور داده شد، و آن گاه عمل هواگیری به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. آماده‌سازی ستون‌های تعویض یون برای نمونه: برای جلوگیری از

سپس عمل تلخی‌زدایی در سه مرحله انجام شد. در مرحله اول زیتون‌ها در یک محلول سود سوزآور ۱/۲ درصد وزن به حجم، به مدت دو ساعت غوطه‌ور شدند. پس از آن از محلول سود سوزآور بیرون آورده شده، یک بار با آب شست شو گردیدند، و تا روز بعد (۲۲ ساعت) در آب معمولی نگهداری شدند. روز بعد زیتون‌ها در محلول سود سوزآور یک درصد وزن به حجم به مدت چهار ساعت قرار گرفته، پس از یک آبکشی با آب، تا روز بعد در مخزن آب نگهداری شدند. در روز سوم زیتون‌ها در سود سوزآور ۰/۸ درصد وزن به حجم به مدت شش ساعت نگهداری شده، مجدداً آبکشی گردیدند. میزان نفوذ سود سوزآور به داخل گوشت زیتون نیز طی سه مرحله تلخی‌زدایی کنترل می‌شد. در مرحله سوم نفوذ آن به داخل گوشت زیتون کامل شده، سود سوزآور به هسته زیتون رسیده بود. در روز چهارم توسط شست‌شوی زیتون‌ها با آب معمولی، قلیابیت موجود در آنها رفع گردید. برای این منظور، آن قدر زیتون‌ها شست شو داده شدند تا وجود سود سوزآور در زیتون‌ها به وسیله معرف شیمیایی فنل‌فتالین منفی شد. معمولاً سه تا چهار بار شست‌شو با آب کافی بود.

تا این مرحله فرایند برای تمام روش‌ها یکسان بود. از این به بعد برای تولید کنسرو به دو روش اقدام گردید، که هر کدام با شرایط خاص خود معرفی می‌شود. این روش‌ها شامل تخمیر طبیعی و تخمیر هدایت شده می‌باشد.

تهیه کنسرو زیتون با روش تخمیر طبیعی (۶): در این روش چهار رقم زیتون کالاماتا، ماری، زرد و فیشمی به کار برده شد. پس از تلخی‌زدایی، زیتون‌ها به مدت یک هفته در مخزن‌های پلی اتیلنی در باز، حاوی محلول دو درصد آب نمک و ۰/۱ درصد اسید لاکتیک، نگهداری گردیدند (۱۱). سپس با محلول هشت درصد نمک در شیشه‌هایی به ظرفیت ۴۰۰ گرم ریخته شده، پس از عبور از تونل هواگیری درب شیشه‌ها بسته شد و به اتاق تخمیر با دمای ثابت 25°C منتقل گردیدند (۲۰).

تهیه کنسرو زیتون به روش تخمیر هدایت شده (۱۰ و ۲۰): در این روش نیز چهار رقم زیتون کالاماتا، ماری، زرد و فیشمی

تعیین درصد بازیافت اسیدهای آلی (۷): در این مورد، یک میلی لیتر از نمونه‌ای که میزان اسیدهای آلی آن قبلاً اندازه‌گیری شده بود، به داخل هشت عدد بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری انتقال داده شد. یک میلی لیتر از هر یک از محلول‌های ۰/۱ درصد اسیدهای آلی سیتریک، مالیک، لاکتیک و استیک به هر یک از بالن‌ها اضافه شد و با محلول بافر اسیدی EDTA به حجم رسانیده شد. سپس مراحلی که برای تهیه نمونه انجام گرفته بود برای این محلول‌ها انجام گردید. برای به دست آوردن درصد بازیافت، از هر یک از نمونه‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر با دو تکرار به دستگاه تزریق شد و سطوح هر یک از منحنی‌های به دست آمده با توجه به زمان ماندگاری آنها ثبت گردید. با محاسبه غلظت هر یک، میزان اسیدهای آلی با مقدار اولیه اضافه شده به نمونه‌ها مقایسه، و درصد بازیافت محاسبه گردید.

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق تمام نمونه‌برداری‌ها به صورت تصادفی انجام گرفت. عوامل مؤثری که بر فرایند تأثیر داشتند شامل ارقام زیتون، انجام تلقیح با مایع میکروبی لاکتوباسیلوس پلاتناروم و یا تخمیر طبیعی توسط میکروفلور زیتون، و زمان تخمیر مورد بررسی قرار گرفت. در تمام آزمون‌ها از تجزیه واریانس و نیز اثر متقابل میانگین‌ها استفاده شد و آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌های تیمارهای مختلف و سطوح آنها به کار رفت. طرح آماری به صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بود.

نتایج و بحث

ارزیابی تغییر اسیدیته کل محلول دربرگیرنده زیتون تغییر اسیدیته کل محلول دربرگیرنده زیتون براساس درصد وزن به حجم اسید لاکتیک محاسبه گردید. عموماً تغییر در اسیدیته کل برعکس تغییر pH محلول دربرگیرنده زیتون است (۴). وقتی اسیدیته به بیش از ۰/۵ درصد بر حسب اسید لاکتیک

خسارات آنیون‌های مزاحم، ستونی تهیه شد که یون‌ها و مواد مزاحم را از نمونه‌ها جدا کند. برای این منظور، رزین تعویض آنیون با قدرت جانشین کردن یون هیدروکسی، به جای آنیون استفاده شد.

تهیه نمونه از زیتون: چند عدد زیتون به عنوان نمونه هسته‌گیری و گوشت آنها در یک هاون چینی ساییده شد تا کاملاً یک‌نواخت گردید. سپس دو گرم از این گوشت یک‌نواخت شده، توزین و در یک بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتری قرار گرفته، به وسیله محلول بافر اسیدی EDTA به حجم رسانیده شد. این محلول رقیق شده با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از عبور از صافی تحت خلأ ۴/۵ میکرون، پنج میلی لیتر آن از ستون تعویض کاتیون، سپس از صافی میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون گذرانیده شد (۲۰).

اندازه‌گیری اسیدهای آلی: مشخصات دستگاه HPLC که برای اندازه‌گیری اسیدهای آلی به کار برده شد، عبارت بود از ستون جداکننده به ابعاد ۷/۹ در ۳۰۰ میلی متر از نوع غربالی یونی با مدل SCR - 101H برای تجزیه اسیدهای آلی، محافظ ستون SCR (H)، سیستم فاز متحرک ایزوکراتیک، فاز متحرک محلول اسید سولفوریک رقیق ۰/۰۰۹ نرمال با pH برابر ۲/۱، سرعت حرکت فاز متحرک ۰/۷ میلی لیتر در دقیقه، حساسیت رقت^۱ سیستم برابر ۴، سرعت چارت برابر پنج میلی متر در دقیقه، درجه حرارت مورد استفاده برای ستون ۷۵°C، شناساگر U.V ماورای بنفش در طول موج ۲۱۰ نانومتر.

تهیه منحنی‌های استاندارد اسیدهای آلی: غلظت‌هایی که برای تهیه منحنی استاندارد به کار رفت بستگی به مقدار اسید آلی موجود در نمونه داشت. به این دلیل غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ درصد وزن به حجم برای اسیدهای لاکتیک، سیتریک و غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۰۵ برای اسید استیک تهیه شد. میزان لازم توزین شده و در بالن ژوژه با محلول بافر به حجم رسانیده شد. پس از تزریق با دو تکرار برای هر رقت، اطلاعات مربوط به سطح زیر منحنی به دست آمد، و در تهیه منحنی‌های استاندارد هر اسید آلی به کار رفت (۸).

زیادتری تولید کرده‌اند. آزمون شمارش میکروبی زیتون‌ها نشان داد که فلور میکروبی غالب آنها از نوع لاکتوباسیلوس‌های تولید کننده اسید است. رشد یاخته‌های میکروبی تولید کننده اسید در زیتون کمتر از سایر سبزیجات است، چون نفوذ قند از بافت زیتون کندتر از سایر سبزیجات صورت می‌گیرد. میوه‌های رسیده نیز عموماً رشد یاخته‌ها را به دلیل قابلیت نفوذ پوستشان نسبت به مواد مغذی بیشتر تشویق می‌کنند (۱۴). مصرف کربوهیدرات‌ها عموماً در روز دوم بعد از تلقیح شروع می‌شود، و تخمیر وقتی پایان می‌یابد که قندهای احیا از بین رفته باشند (۲۰).

اندازه‌گیری اسیدهای آلی با سیستم HPLC

پس از تزریق نمونه‌ها به سیستم HPLC و تهیه منحنی حاصل از تزریق (شکل ۲) و ضبط آن، ابتدا با مقایسه زمان ماندگاری، منحنی‌های به دست آمده با استانداردهای اسیدهای آلی، شناسایی کیفی شده، سپس سطح زیر هر منحنی با توجه به منحنی استاندارد مربوطه (شکل ۱) که با روش ذکر شده تهیه شد، و با توجه به ضریب رقت که از نمونه گوشت زیتون تا تبدیل آن به نمونه‌های انتهایی به دست آمد، غلظت اسیدهای آلی در گوشت زیتون در هر مرحله محاسبه گردید. درصد بازیافت اسیدهای آلی لاکتیک، استیک، سیتریک و مالیک در این آزمایش طبق روش ذکر شده تعیین و در جدول ۱ ثبت شد. تغییر اسید لاکتیک: مهم‌ترین اسیدی که در تخمیر بی‌هوازی تولید می‌شود، اسید لاکتیک است. نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که در سطح یک درصد خطا، تمام فاکتورها، بجز فاکتور تلقیح یا نوع تخمیر در تغییر کمی اسید لاکتیک دخالت معنی‌داری دارند. با توجه به جدول ۷، در میان ارقام زیتون، بیشترین اسید لاکتیک در رقم زرد تولید شده است. در رده بعد دو رقم فیشمی و کالاماتا قرار دارند، و کمترین مقدار تولید اسید لاکتیک در رقم ماری مشاهده گردید.

همان‌طور که بیان شد، تخمیر طبیعی و هدایت شده (اجباری) از نظر تولید اسید مشابه هستند، و تفاوت معنی‌داری

برسد، شرایط برای نگهداری زیتون مناسب است (۵). اسیدیته کل با زمان افزایش می‌یابد، و در پایان تخمیر به حدی می‌رسد که برای نگهداری زیتون مناسب باشد (۶).

اطلاعات مربوط به اسیدیته کل ارقام زیتون در طول زمان تخمیر به دست آمد. طبق جدول ۲، تولید اسیدیته کل در هر رقم زیتون با نمونه تخمیر شده خود اختلاف معنی‌داری ($P < 0/01$) نشان داد. عواملی مانند رقم، تلقیح و زمان به صورت معنی‌دار در امر تولید اسید دخالت داشت. نتایج جدول ۷ نشان می‌دهد که بیشترین نسبت اسیدیته کل تولید شده به ترتیب در ارقام کالاماتا، آب نمکی، و سپس در کالاماتا، تخمیری تولید شده است. این دو از نظر تولید اسیدیته کل در دو گروه متفاوت قرار دارند. به دنبال آنها زیتون‌های ارقام ماری آب نمکی و تخمیری در سطوح پایین‌تری قرار گرفته‌اند. مقدار تولید اسیدیته کل در دو رقم فیشمی آب نمکی و زرد تخمیری یکسان بوده و آنها نیز در یک گروه قرار می‌گیرند. کمترین مقدار تولید اسیدیته کل در فیشمی تخمیری دیده می‌شود. تولید اسیدیته کل به ترتیب در کالاماتا و ماری در بیشترین حد بوده است. دو رقم زرد و فیشمی در یک گروه، در رتبه سوم قرار دارند.

شکل‌های ۳ و ۴ روند تولید اسیدیته کل را به ترتیب در دو نوع تخمیر طبیعی و هدایت شده (اجباری) نشان می‌دهند. به طوری که در شکل‌های مذکور ملاحظه می‌شود، در تخمیر طبیعی از ابتدای فرایند بر مقدار اسیدیته کل به صورت پیوسته و با شیب ملایم افزوده شده است. در روز ۵۵ تخمیر به حد $0/65-0/85$ درصد رسید، در حالی که در تخمیر هدایت شده (اجباری)، در ده روز اول، شیب افزایش اسیدیته کل کم بوده و پس از آن با سرعت زیادی اسید تولید شده است. در روز ۳۵ تخمیر به $0/55-0/65$ درصد رسید. این پدیده ممکن است به دلیل فعالیت یاخته‌های باکتری اسید لاکتیک باشد، که پس از تطابق، تولید اسید را آغاز کرده‌اند. هم‌چنین، در کل، در تخمیر طبیعی نسبت به تخمیرهای هدایت شده (اجباری) مقدار اسیدیته کل بیشتری تولید شده است. دلیل آن می‌تواند شرکت تعداد بیشتر یاخته در تولید اسید باشد، که در نتیجه مقدار اسید

بررسی تغییر کمی و کیفی اسیدهای آلی طی فرایند کنسرو زیتون، ...

جدول ۱. درصد بازیافت اسیدهای آلی در نمونه زیتون تهیه شده با دستگاه HPLC

درصد بازیافت	کل مقدار اسید اندازه گیری شده	میلی گرم اسید موجود در نمونه	میلی گرم اسید اضافه شده به نمونه	اسید آلی
۹۹/۹	۲۳۵	۱۳۵/۱	۱۰۰	اسید لاکتیک
۹۹/۵	۱۸۸	۸۸/۵	۱۰۰	اسید استیک
۸۵/۰	۱۶۸/۵	۸۳/۵	۱۰۰	اسید سیتریک
۹۲/۶	۸۵/۵	۳۹/۲	۵۰	اسید مالیک

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف رقم، تلقیح و زمان بر میزان اسید لاکتیک موجود در میوه زیتون، طی ۱۰۰ روز تخمیر در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	عدد F
تیمار	۵۲	۱۵۴۵/۳	۲۹/۷۱	۳۷۲/۳۶**
رقم	۳	۳۳/۲۴	۱۱/۰۸	۱۳۸/۸۷**
تلقیح	۱	۴/۷۲	۴/۷۲	۵۹/۰۹**
زمان	۹	۱۴۶۲/۱۶	۱۶۲/۴۶	۲۰۳۵/۶۴**
خطای آزمایشی	۱۵۹	۸/۵۴	۰/۰۷۹	-

** معنی دار در سطح یک درصد

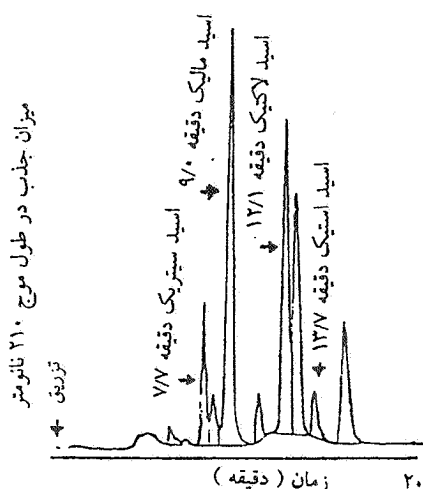
جدول ۳. تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف رقم، تلقیح و زمان بر میزان اسید لاکتیک موجود در میوه زیتون، طی ۱۰۰ روز تخمیر در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	عدد F
تیمار	۵۲	۱۵۱۲۳۳۳۱/۷	۲۹۰۸۳۳/۳	۲۸/۱۱**
رقم	۳	۹۷۶۳۹۹/۷	۳۲۵۴۶۶/۶	۳۱/۴۶**
تلقیح	۱	۲۵۷۳/۸	۲۵۷۳/۸	۰/۲۷ ^{NS}
زمان	۹	۹۴۶۸۱۰۹/۵	۱۰۵۲۰۱۲/۲	۱۰۱/۶۸**
خطای آزمایشی	۱۵۹	۱۱۰۷۰۸۷/۵	۱۰۳۴۶/۶	-

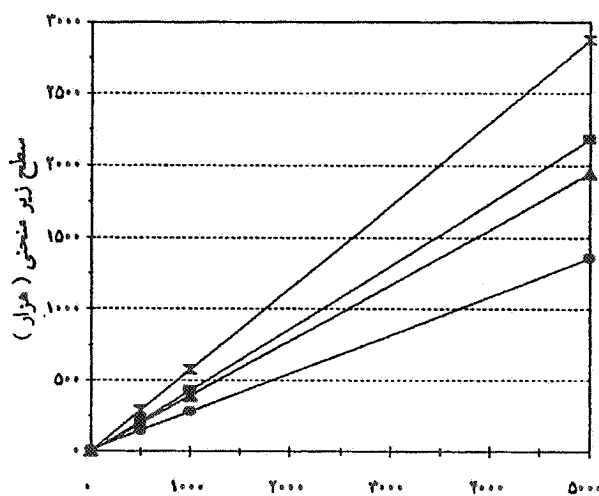
** معنی دار در سطح یک درصد NS غیر معنی دار در سطح یک درصد

ترتیب بیشتری مقدار تولید اسید لاکتیک عبارتند از: گروه اول زرد تخمیری هدایت شده (اجباری) (۱۴۰۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت زیتون)، گروه دوم زرد آب نمکی، گروه سوم فیشمی آب نمکی، گروه چهارم کالاماتای تخمیری و آب نمکی به همراه فیشمی تخمیری، و گروه پنجم ماری آب نمکی و ماری

بین آنها در سطح یک درصد خطا دیده نشد. مقایسه میانگین ارقام مختلف با تخمیرهای دوگانه در سطح یک درصد خطا، مؤید این است که بیشترین اسید تولید شده در زیتون رقم زرد تخمیری و کمترین مقدار در ماری تخمیری است. از نظر تولید اسید، ارقام هشت گانه زیتون در پنج گروه قرار دارند، که به



شکل ۲. منحنی اسیدهای آلی در زیتون کالاماتا تخمیری تهیه شده با HPLC در شرایط ایزوکراتیک، سرعت جریان فاز متحرک ۰/۷ میلی لیتر در دقیقه، دمای ستون ۷۵ درجه سانتی‌گراد با شناساگر اسپکتروفتومتری



شکل ۱. منحنی‌های استاندارد اسیدلاکتیک (■)، استیک (●)، مالیک (▲) و سیتریک (×).

تخمیری (۵۸۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت زیتون).

در شکل‌های ۵ و ۶ که به ترتیب نشان دهنده تغییرات کمی تولید اسید لاکتیک در زیتون‌های تخمیر طبیعی (۶۸۰-۱۱۰۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت زیتون) و تخمیر هدایت شده یا اجباری (۵۸۰-۱۴۸۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت زیتون) می‌باشند، رقم شاخص در هر دو گروه، زیتون زرد است که نسبت به سایر گونه‌ها تولید اسید بیشتری داشته است. طبق پژوهش‌های قبلی معلوم شده است که اسید اصلی تولید شده در حین تخمیر، اسید لاکتیک می‌باشد (۶ و ۲۰)، و مقدار آن در مرحله رشد به طور لگاریتمی زیاد شده، و در طول مرحله ثابت رشد به بیشترین مقدار خود می‌رسد.

تغییر اسید استیک: اگر چه مقدار اسید استیک نسبت به اسید لاکتیک در سطح خیلی پایین‌تری است، ولی یک روند هماهنگ را در طول زمان تخمیر طی کرده است. نتایج جدول ۴ در سطح یک درصد خطا معلوم داشت که تمام عوامل رقم، تلقیح و زمان، در تولید اسید استیک نقش معنی‌داری دارند. از نظر مقایسه ارقام زیتون طبق نتایج جدول ۷، بیشترین مقدار اسید استیک تولید شده به ترتیب در ارقام فیشمی، کالاماتا، زرد و ماری مشاهده شد.

از نظر تخمیر، در تخمیرهای هدایت شده (اجباری) اسید استیک بیشتری (۱۲۰-۳۴۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت زیتون) نسبت به تخمیر طبیعی (۱۰۰-۱۵۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت زیتون) تولید گردیده است. شکل‌های ۷ و ۸ اختلاف تولید اسید استیک را در دو نوع تخمیر طبیعی و هدایت شده نشان می‌دهند. طبق اشکال فوق، ارقام فیشمی در هر دو نوع تخمیر با سرعت بیشتر، مقدار زیادتری اسید استیک تولید کرده است. طبق مطالعات ماتانو و همکاران (۱۶ و ۲۰) معلوم شد که بعد از فرایند تلخی‌زدایی و قبل از رشد میکروبی، مقدار اسید استیک میوه زیتون به صورت قابل توجهی زیاد می‌شود. دلیل آن را تبدیل قندها به اسیداستیک، بر اثر فرایند قلیایی کردن دانسته‌اند. در این تحقیق مقدار اسید استیک در روزهای ۲۵-۳۰ تخمیر به اوج خود رسیده است.

تغییر اسید سیتریک: یکی از اسیدهای غالب میوه زیتون اسید سیتریک است. نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد که در سطح یک درصد خطا، میانگین‌های مقدار اسید سیتریک برای رقم فیشمی تخمیری کمترین تغییر و کالاماتا تخمیری بیشترین تغییر را

بررسی تغییر کمی و کیفی اسیدهای آلی طی فرایند کنسرو زیتون،....

جدول ۴. تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف رقم، تلقیح و زمان بر میزان اسیداستیک موجود در میوه زیتون، طی ۱۰۰ روز تخمیر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

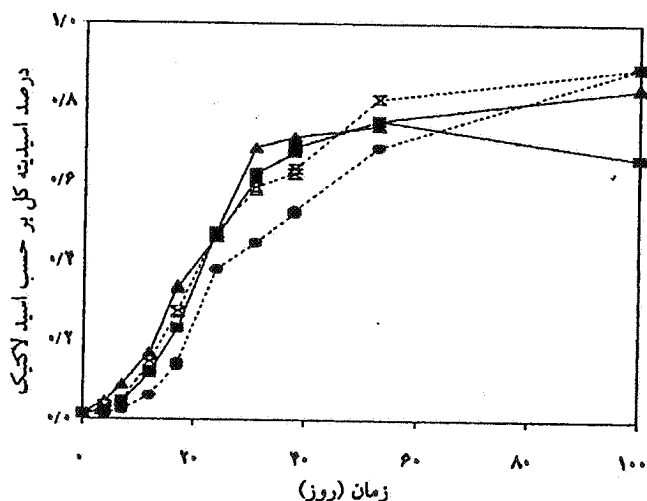
منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	عدد F
تیمار	۵۲	۵۰۰۹۹۶/۳	۹۶۳۴/۵	۳۳/۰۳**
رقم	۳	۱۱۹۳۴۵/۹	۳۹۷۸۱/۵	۱۳۶/۳۹**
تلقیح	۱	۸۶۰۰۰/۶	۸۶۰۰۰/۶	۲۹۴/۸۴**
زمان	۹	۹۴۶۸۱۰/۵	۱۰۵۲۰۱۲/۲	۱۰۱/۶۸**
خطای آزمایشی	۱۵۹	۱۱۰۷۰۸۷/۵	۱۰۳۴۶/۶	-

** معنی دار در سطح یک درصد

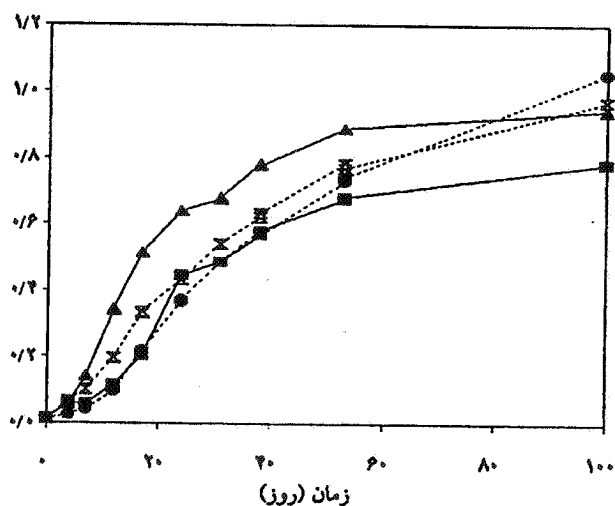
جدول ۵. تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف رقم، تلقیح و زمان بر میزان اسیدسیتریک موجود در میوه زیتون، طی ۱۰۰ روز تخمیر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	عدد F
تیمار	۵۲	۱۹۲۷۰۹/۱	۳۷۰۵/۹	۳۴/۳۸**
رقم	۳	۸۰۸۶/۷	۲۶۹۵/۶	۲۵/۰۱**
تلقیح	۱	۵۵۷۹/۵	۵۵۷۹/۵	۵۱/۷۷**
زمان	۹	۱۴۹۱۳۵/۴	۱۶۵۷۰/۶	۱۵۳/۷۴**
خطای آزمایشی	۱۵۹	۱۱۵۳۲/۵	۱۰۷/۸	-

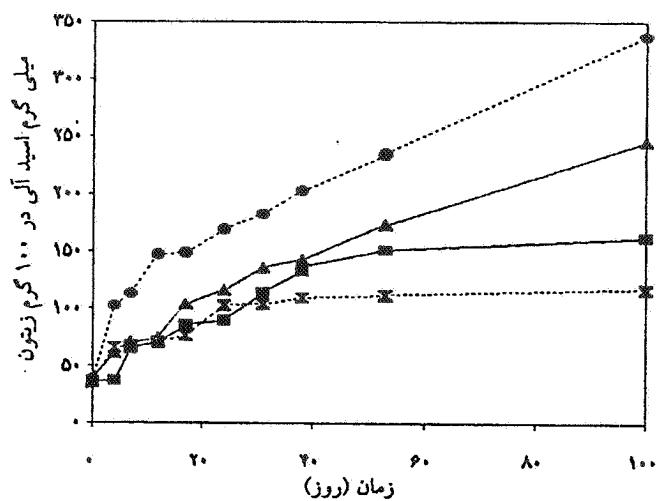
** معنی دار در سطح یک درصد



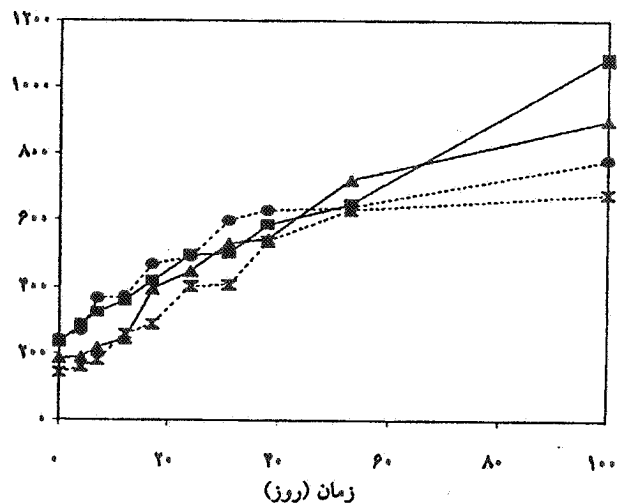
شکل ۴- تغییر اسیدته کل طی تخمیر اجباری (علائم مطابق شکل ۱)



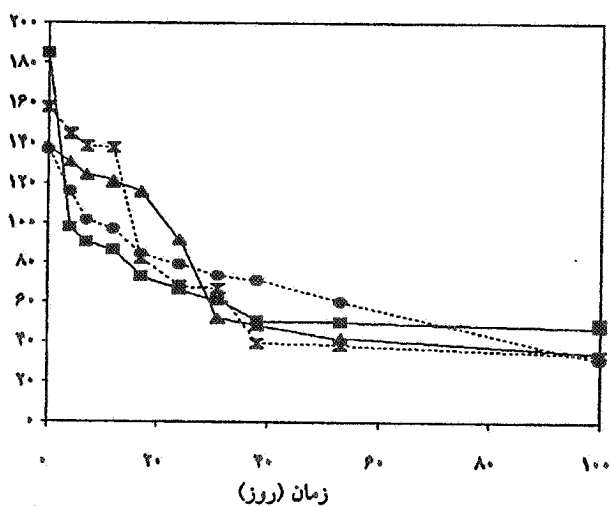
شکل ۳- تغییر اسیدته کل طی تخمیر طبیعی (علائم مطابق شکل ۱)



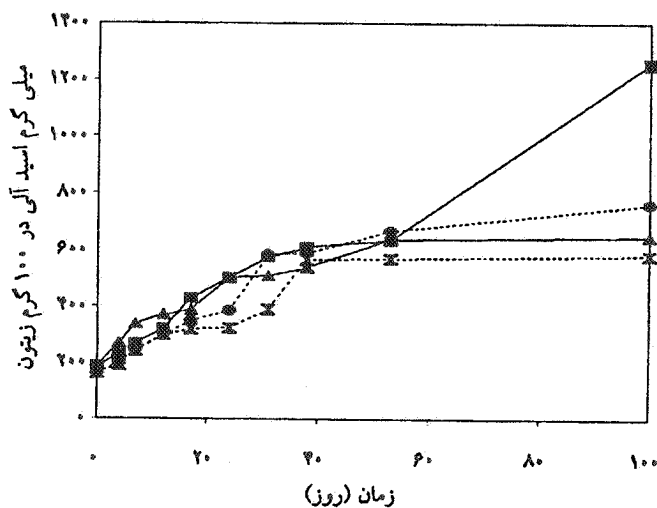
شکل ۸. تغییر اسیدلاکتیک طی تخمیر اجباری



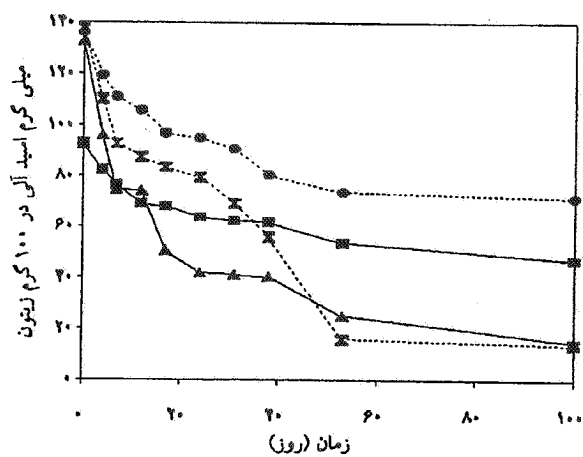
شکل ۵. تغییر اسیدلاکتیک طی تخمیر طبیعی



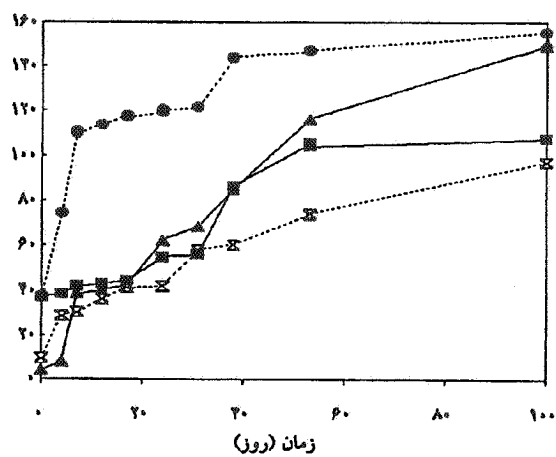
شکل ۹. تغییر اسیدسیتریک طی تخمیر طبیعی



شکل ۶. تغییر اسیدلاکتیک طی تخمیر اجباری



شکل ۱۰. تغییر اسیدسیتریک طی تخمیر اجباری



شکل ۷. تغییر اسیدلاکتیک طی تخمیر طبیعی

(علائم منحنی‌ها مطابق شکل ۱)

کالاماتا و فیشمی مشاهده شد. در مورد نوع تخمیر، از نظر آماری در سطح یک درصد خطا، بین دو تخمیر طبیعی و هدایت شده (اجباری) فرقی مشاهده نشد. شکل‌های ۱۱ و ۱۲ به ترتیب تغییرات اسیدمالیک را در ارقام زیتون با تخمیر طبیعی (۰-۱۰۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت زیتون) و هدایت شده یا اجباری (۴۰-۷۵ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت زیتون) نشان می‌دهند، و اثر زمان را بر کاهش اسیدمالیک معلوم می‌دارند. در کل، فرقی بین نوع تخمیر در کم شدن مقدار اسیدمالیک مشاهده نگردید. طبق پژوهش مانتانو و همکاران (۲۰)، اسیدمالیک بعد از پنج روز اول تخمیر به کلی ناپدید شده و هر دو اسیدسیتریک و مالیک به صورت ۱۰۰ درصد متابولیزه شده‌اند.

تغییر سایر اسیدهای آلی: علاوه بر اسیدهای فوق که روند مشخصی در تغییرات کمی خود نشان دادند، چند اسید دیگر نیز در زیتون شناسایی شد که تغییرات آنها روند خاصی نداشت، و یا این که در زمان‌های خاصی تولید شده بودند، که شامل موارد زیر می‌باشند:

الف) اسیدسوکسینیک: این اسید آلی در تمام نمونه‌ها به مقدار خیلی کم و حدوداً در روزهای چهارم تخمیر به بعد در نژادها پایدار گردید و مقدار آن جزئی بود. در تحقیقات گذشته (۲۰)، اسیدسوکسینیک در زیتون شناسایی شده، و از روز دهم به مقدار کم و آهسته شروع به افزایش کرده است.

ب) اسیدفورمیک: این اسید به مقدار جزئی در سه رقم زیتون فیشمی آب نمکی، فیشمی تخمیری و زرد آب نمکی در اواخر دوره تخمیر، و از روز پنجاهم به بعد مشاهده شد. البته مقدار آن در رقم فیشمی بیشتر از زرد بود.

پ) اسیدپروویک: این اسید در تمام نژادها شناسایی شد، ولی در هیچ کدام روند خاصی برای تغییر آن مشاهده نگردید.

ت) اسیدبوتیریک: این اسید در آخرین ارزیابی، در رقم فیشمی تخمیری به مقدار بسیار جزئی مشاهده شد. گزارش شده است که هفت روز بعد از تخمیر بی‌هوای مقدار اسیدمالیک، سیتریک و استیک به ترتیب $\frac{۵}{۸}$ ، $\frac{۴}{۵}$ و $\frac{۷}{۵}$ درصد وزن به حجم بوده است (۱۳ و ۲۰).

داشته‌اند. از نظر مقایسه ارقام زیتون، با توجه به نتایج جدول ۷، بیشترین تغییرات را ارقام زرد و کالاماتا، و در گروه بعد رقم ماری و سپس رقم فیشمی داشته‌اند.

از نظر تلقیح و نوع تخمیر، تخمیر هدایت شده (اجباری) نسبت به تخمیر طبیعی تغییرات بیشتر و شدیدتری را در اسید سیتریک زیتون‌ها به وجود آورده است. شکل‌های ۹ و ۱۰ به ترتیب تغییرات کمی اسید سیتریک را در ارقام زیتون در دو نوع تخمیر طبیعی و هدایت شده (اجباری) نشان می‌دهند و معلوم می‌دارند که تغییرات اسیدسیتریک در تخمیر طبیعی هماهنگ‌تر از تخمیر هدایت شده (اجباری) بوده، در نهایت سطح اسیدسیتریک در ارقام زیتون تخمیر طبیعی همه به یک حد پایین آمده است (۳۵-۵۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت زیتون)، در حالی که در تخمیر هدایت شده (اجباری)، آخرین سطح اسیدسیتریک (۱۸-۷۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت زیتون) در ارقام مختلف با هم متفاوت است. طبق پژوهش مک فیتز و همکارانش (۱۹)، اسیدهای غالب زیتون اسیدمالیک و اسیدسیتریک تشخیص داده شده است، که به صورت ۱۰۰ درصد در طول تخمیر از بین رفته‌اند. اما اسید مالیک خیلی سریع‌تر ناپدید شده، که این اسید به وسیله آنزیم مالولاکتات به اسیدلاکتیک و دی‌اکسیدکربن تجزیه گردیده است (۱۲ و ۲۱). درینان و همکاران (۹) عقیده داشتند اسیدسیتریک ممکن است به صورت انتقال فعال تبدیل به سیترات شود، و در سیکل غیرهوای متابولیسم سیترات تبدیل به دی‌اکسیدکربن، استات، استوئین، دی‌استیل و ۲-۳ بوتیلن گلایکول گردد (۷). اسیدسیتریک به آهستگی تا روز ۱۲۵ام از بین رفته است.

تغییر اسیدمالیک: اسیدمالیک نیز جزو اسیدهای غالب موجود در میوه زیتون است. نتایج جدول ۶ نشان می‌دهد که تمام عوامل رقم، تلقیح و زمان در سطح یک درصد خطا، معنی‌دار می‌باشند، و طبق جدول ۷ بیشترین تغییرات در زیتون‌های رقم ماری آب نمکی و زرد تخمیری، و کمترین تغییرات در کالاماتای آب نمکی و فیشمی آب نمکی رخ داده است. از نظر ارقام زیتون، بیشترین تغییرات به ترتیب در ارقام زرد، ماری،

جدول ۶. تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف رقم، تلقیح و زمان بر میزان اسیدمالیک موجود در میوه زیتون، طی ۱۰۰ روز تخمیر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

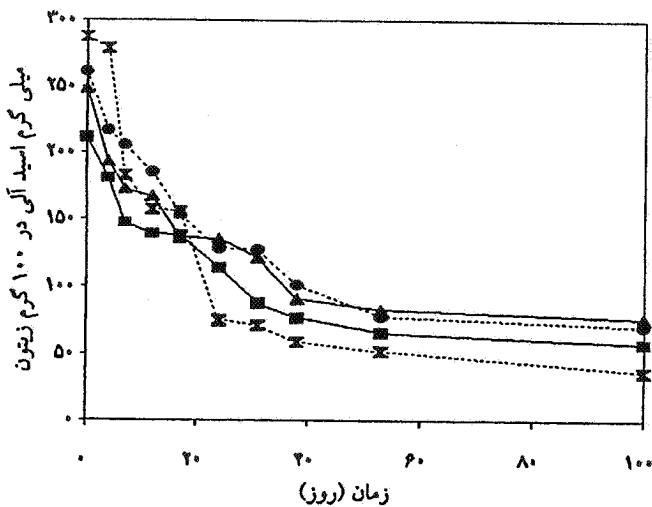
منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	عدد F
تیمار	۵۲	۹۱۷۱۹۸/۹	۱۷۶۳۸/۴	۷۷/۳۳ ^{***}
رقم	۳	۴۰۸۷۰/۵	۱۳۶۲۳/۵	۵۹/۷۲ ^{***}
تلقیح	۱	۹۳۸۴/۶	۹۳۸۴/۶	۴۱/۱۴ ^{***}
زمان	۹	۷۸۸۰۶۰/۶	۸۳۱۱۷/۸	۳۶۴/۳۸ ^{***}
خطای آزمایشی	۱۵۹	۲۴۴۰۷/۳	۲۸۸/۱	-

***: معنی دار در سطح یک درصد

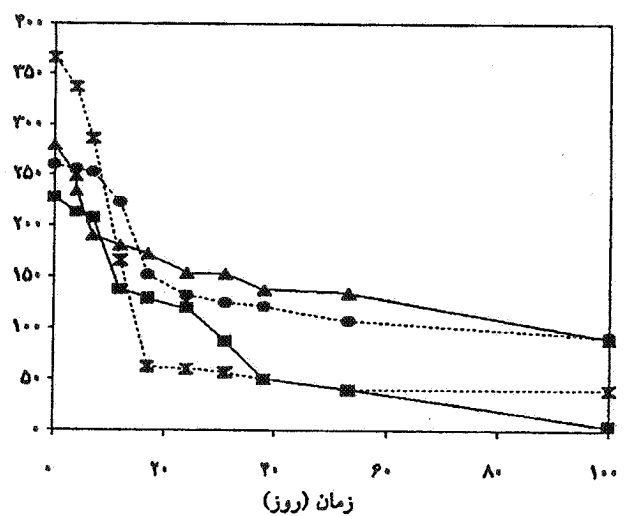
جدول ۷. مقایسه میانگین تغییرات اسیدهای آلی ارقام مختلف زیتون به وسیله آزمون دانکن در سطح یک درصد

میانگین اسید پسته کل	میانگین اسید لاکتیک	میانگین اسیداستیک	میانگین اسیدمالیک	میانگین اسیدسیتریک	
۵/۰۰۳ ^A	۴۳۷/۳ ^{DC}	۶۱/۴۸ ^D	۱۷۳/۳ ^A	۸۹/۸۲ ^{BA}	کالاماتای آب نمکی
۴/۱۰۷ ^B	۴۳۹/۲ ^{DC}	۱۱۶/۶ ^B	۱۴۲/۴ ^{CB}	۵۹/۱ ^D	کالاماتای تخمیری
۴/۰۶ ^{CB}	۳۶۸/۷ ^D	۴۷/۷۲ ^D	۱۴۶/۶ ^{CB}	۹۰/۸ ^{BA}	ماری آب نمکی
۳/۸۲۹ ^{DC}	۳۶۴/۰ ^D	۸۶/۳۸ ^C	۱۳۵/۵ ^C	۷۸/۵۶ ^C	ماری تخمیری
۳/۴۱۷ ^E	۵۳۴/۲ ^B	۶۱/۳۵ ^D	۱۲۱/۶ ^D	۸۰/۸۵ ^C	زرد آب نمکی
۳/۶۰۱ ^{ED}	۶۳۱/۹ ^A	۹۴/۶۹ ^C	۱۲۱/۸ ^D	۶۷/۶۸ ^D	زرد تخمیری
۳/۶۰۸ ^{ED}	۵۳۴/۴ ^B	۱۰۹/۳ ^B	۱۷۲/۱ ^A	۸۵/۱۱ ^{CB}	فیشمی آب نمکی
۳/۱۷۸ ^F	۴۲۳/۶ ^{DC}	۱۶۷/۷ ^A	۱۵۲/۶ ^B	۹۸/۰۱ ^A	فیشمی تخمیری

اعداد با حروف مشابه فاقد اختلاف معنی داری می‌باشند.



شکل ۱۲. تغییر اسیدمالیک طی تخمیر اجباری



شکل ۱۱. تغییرات اسیدمالیک طی تخمیر طبیعی

(علائم منحنی‌ها مطابق شکل ۱)

سپاسگزاری

وسیله قدردانی می‌شود. از آقایان مهندس بهرامی، مهندی بیژن قناعتی و رمضانعلی ردانی‌پور نیز به خاطر کمک در عملیات آزمایشگاهی این طرح تشکر می‌گردد.

بخشی از هزینه انجام این تحقیق از طرف سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و بخش دیگر توسط دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان تأمین گردیده است که بدین

منابع مورد استفاده

۱. منیعی، ع.ع. ۱۳۷۳. چرا زیتون؟ مجله زیتون، ۱۴: ۱۱۹-۱۷.
۲. میرمنصوری، ا. ۱۳۷۳. بررسی و مقایسه خواص کیفی ارقام زیتون به منظور تعیین ارقام مناسب جهت تولید کنسرو زیتون. برگزیده مقالات اولین گردهم‌آبی سراسری بررسی مسایل زیتون در گرگان، وزارت کشاورزی، ص ۲۳۵-۲۳۹.
۳. طباطبایی، م. ۱۳۷۴. اهمیت غذایی زیتون. مجله زیتون ۱۲۷: ۳۸-۴۱.
۴. طباطبایی، م. ۱۳۷۴. زیتون و روغن آن. صندوق مطالعاتی توسعه کشت زیتون، ۳۹۹ صفحه.
5. Anoun. 1974. Joint FAO/WHO Food Standards Program Codex Alimentarius Commission. Recommended International Standard for Table Olives. 37 p.
6. Bobillo, M. and V. M. Marshall. 1991. Effect of salt and culture aeration on lactate and acetate production by *Lactobacillus plantarum*. Food Microbiol. 8(2): 153-160.
7. Dokhani, S. 1998. HPLC analysis of organic acids in recombined Iranian fermented white cheese. Iran J. Agric. Res. 17(2). Accepted for Publication.
8. Dokhani, S., B Ooraikul, M. Palcic and D. Hadziyev. 1988. High performance liquid chromatographic analysis of sugars in raw and processed potatoes. Iran J. Agric. Res. 7: 23-36.
9. Drinan, D. F., S. Tobin and T. M. Cogan. 1976. Citric acid metabolism in heterohomofermentative lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbio. 31: 481-486.
10. Duran, M. C., P. Garcia, M. Brenes and A. Garrido. 1994. Induced lactic acid fermentation during the preservation stage of ripe olives from Hojiblanca cultivar. J. Appl. Bacteriol. 76(4): 377-382.
11. Duran, M. C., P. Garcia, M. Brenes and A. Garrido 1994. *Lactobacillus plantarum* survival in aerobic, directly brined olives. J. Food Sci. 59(6): 1197-1201.
12. Duran, M. C., P. Garcia, M. Brenes and A. Garrido. 1993. *Lactobacillus plantarum* survival during the first days of ripe olive brining. Appl. Microbiol. 16(1): 153-158.
13. Etchells, J. L., A. F. Brog, I. D. Kittel, T. A. Bell and H. P. Fleming. 1966. Pure culture fermentation of green olives. Appl. Microbiol. 14: 1027-1041.
14. Fernandez Diez, M. J. 1971. The Olive in Biochemistry of Fruits and their Products. Academic Press, New York.
15. Fernandez, M. J., P. Garcia, A. Garrido and M. C. Duran Quintana. 1993. Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar. J. Appl. Bacteriol. 75: 226-233.
16. Fleming, H. P. and J. L. Etchells. 1967. Occurrence of an inhibitor of lactic acid bacteriocin green olives. Appl. Microbiol. 15: 1178-1184.
17. Kiritsakis, A. 1990. Olive Oil. American Oil Chemists' Society, USA.
18. Kiritsakis, A and P. Markakis. 1987. Olive Oil: A review, Adv. in Food Res. 31: 453-482.
19. Mc Feeters, R. F., H. P. Fleming and R. L. Thompson. 1982. Malic acid as a source of carbon dioxide in cucumber juice. J. Food Sci. 47: 1862-1865.

20. Montano, A., A. H. Sanchez and A. De Castro. 1993. Controlled fermentation of spanishtype green olives. J. Food Sci. 58(4): 842-844 & 852.
21. Ruiz Barba J. L., M. Brenes, R. Jimenez, P. Garcia and A. Garrido. 1992. Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brines. J. Appl. Bacteriol. 73: 502-505.