

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİYAH *Aspergillus* SUŞLARI TARAFINDAN KURU ÜZÜM BESİYERİNDE
OKRATOKSİN A (OTA) OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ece GÖKMEN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

HAZİRAN 2016

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİYAH *Aspergillus* SUŞLARI TARAFINDAN KURU ÜZÜM BESİYERİNDE
OKRATOKSİN A (OTA) OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ece GÖKMEN
506141510**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek HEPERKAN

HAZİRAN 2016

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506141510 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Ece GÖKMEN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “SİYAH *Aspergillus* SUŞLARI TARAFINDAN KURU ÜZÜM BESİYERİNDE OKRATOKSİN A (OTA) OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Dilek HEPERKAN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gürhan ÇİFTÇİOĞLU**
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 02 Mayıs 2016
Savunma Tarihi : 06 Haziran 2016

Aileme,

ÖNSÖZ

Ülkemizde meyvelerin kurutularak tüketilmesi yaygın bir uygulamadır. Kurutma işlemi geleneksel yöntemlerle yapılabildiği gibi modern teknikler uygulanarak da gerçekleştirilmektedir. Kuru üzüm de ülkemizde sıklıkla tüketilen bir ürün olup; yaş meyve halinden tüketildiği ana kadar geçen süreçte uygun üretim ve muhafaza koşulları sağlanmadığı takdirde, mikotoksin içeriği bakımından riskli bir ürün grubu haline dönüşmektedir. Bu tez çalışması kapsamında; kuru üzümde gelişme gösteren 2 farklı *Aspergillus* suşunun (*A.niger* ve *A.carbonarius*) okratoksin A (OTA) oluşturma profilleri incelenmiştir.

Öncelikle yüksek lisans tez çalışmamın konusunun belirlenmesinde benim ilgi ve isteklerimi göz önünde bulunduran, yüksek lisans eğitimim boyunca tüm çalışmalarında emeğini, bilgi birikimini, desteğini ve tecrübelerini benimle paylaşan tez danışmanım sayın Prof.Dr.Dilek HEPERKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarım sırasındaki desteklerini benden esirgemeyen Araş. Gör. Meltem BOLLUK arkadaşşıma, zorlu tez sürecinde hoş sohbetiyle, samimiyetiyle ve güleryüzüyle yanımda olan ve bana destek veren canım arkadaşlarım; Selin Dağ'a, Sedef Kalay Gümüş'e, Hale Gökçe Akgül'e, Gonca Çelik'e, hayatımın her anında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme en derin teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Mayıs 2016

Ece Gökmen
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	xi
SEMBOLLER.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı.....	2
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1 Kuru Üzüm Tanımı ve Kuru Üzüm Hakkında Genel Bilgiler	5
2.1.1 Ürün tanımı	5
2.1.2 Üzüm ve kuru üzümün tarihsel gelişimi	6
2.1.3 Türkiye’de üzüm yetiştirilen bölgeler ve kuru üzüm çeşitleri	6
2.1.4 Kuru üzümün sektörel durumu.....	7
2.2 Mikroorganizma Gelişmesini Etkileyen Faktörler	10
2.2.1 Su aktivitesi (a_w).....	11
2.2.2 pH ve asitlik	14
2.2.3 Redoks potansiyelin etkisi (E_h)	15
2.2.4 Besin maddeleri.....	16
2.2.5 Antimikrobiyal bileşikler	17
2.2.6 Osmotik basınç.....	17
2.2.7 Sıcaklık-süre	18
2.2.8 Ortamın gaz bileşimi	19
2.2.9 Bağıl nem	20
2.3 Mikroorganizmaların Gelişme Evreleri.....	21
2.3.1 Lag (uyum) fazı	21
2.3.2 Ekspansiyel/logaritmik artış fazı	21
2.3.3 Sabit faz	22
2.3.4 Logaritmik azalma/ölüm fazı	23
2.4 <i>Aspergillus niger</i> ve <i>A.carbonarius</i> Hakkında Genel Bilgiler	23
2.5 Okratoksin A (OTA) Hakkında Genel Bilgiler	28
2.5.1 OTA’nın kimyasal yapısı.....	28
2.5.2 OTA üreten küf türleri	29
2.5.3 OTA açısından riskli gıda maddeleri.....	29
2.5.4 OTA’nın sağlık üzerine etkileri.....	30
2.5.5 RASFF’de OTA ve kuru üzüm durumu	32
2.5.6 OTA için limit değerler	34

2.6 Kromatografi ve HPLC Hakkında Genel Bilgiler	35
2.6.1 Kromatografinin ortaya çıkışı.....	36
2.6.2 Kromatografik tekniklerin sınıflandırılması.....	36
2.6.3 HPLC tekniği hakkında bilgiler	37
2.6.3.1 HPLC cihazının bileşenleri.....	38
3. MALZEME VE YÖNTEM	43
3.1 Malzeme	43
3.2 Yöntem	43
3.2.1 Besiortamlarının hazırlanması	43
3.2.2 Siyah <i>Aspergillus</i> suşlarının izolasyonu.....	44
3.2.3 Küf spor süspansiyonunun hazırlanması	45
3.2.4 İnokulasyon, inkubasyon ve örneklerin hazırlanması	46
3.2.5 HPLC analizi için gerekli solventlerin, örneklerin hazırlanması ve HPLC ölçümleri	46
3.2.6 pH değerlerinin ölçümü	48
3.2.7 Küf gelişim hızlarının ölçümü	48
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	49
4.1 Küf Spor Süspansiyonunun Hazırlanması ve Spor Sayımı	49
4.2 HPLC’de OTA Standart Çözeltilerinin Hazırlanması.....	50
4.3 HPLC’de OTA Analizi Sonuçları.....	52
4.3.1 HPLC kalibrasyon grafiği.....	52
4.3.2 HPLC grafikleri	53
4.3.3 LOD ve LOQ hesaplaması	53
4.3.4 HPLC’de örneklerde okunan OTA miktarları	54
4.4 Besiortamlarının pH Değerleri	57
4.5 Küf Gelişim Hızlarının Belirlenmesi	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	71

KISALTMALAR

OTA	: Okratoksin A
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
MEA	: Malt Extract Agar
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ppb	: parts per billion (milyarda bir)
DON	: Deoxynivalenol
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TLC	: Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)
PC	: Paper Chromatography (Kağıt Kromatografisi)
GC	: Gas Chromatography (Gaz Kromatografisi)
PEEK	: Polietilenketon
TEFLON	: Politetrafloroetilen
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)
PDA	: Photodiode Array
DG18	: Dichloran Glycerol Agar
LOD	: Limit of Detection (Tespit Limiti)
LOQ	: Limit of Quantification (Tayin Limiti)

SEMBOLLER

a_w	: Su aktivitesi
E_h	: Redoks potansiyeli
μ	: Populasyon ortalaması
σ	: Populasyon standart sapması
t_r	: Alıkonma süresi (retention time)

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Dünya çekirdeksiz kuru üzüm üretim miktarları (bin ton).....	8
Çizelge 2.2 : Ege Bölgesi çekirdeksiz kuru üzüm bağ alanları ve üretim miktarları. .	9
Çizelge 2.3 : Çekirdeksiz kuru üzüm tüketim miktarları.....	9
Çizelge 2.4 : Türkiye çekirdeksiz kuru üzüm ihracat durumu.....	10
Çizelge 2.5 : Bakteri, maya ve küflerin geliştirdikleri pH değerleri.....	15
Çizelge 2.6 : Sıcaklık gereksinimlerine göre mikroorganizmalar ve gelişme sıcaklıkları.....	19
Çizelge 2.7 : Son 5 yıllık RASFF orijinal bildirim sayıları.....	33
Çizelge 2.8 : Gıda ve yemlerde mikotoksin bildirimleri.....	33
Çizelge 2.9 : Gıdalarda OTA için maksimum limit değerler.....	34
Çizelge 2.10 : TGK'ye göre OTA maksimum limitleri.....	34
Çizelge 3.1 : Farklı konsantrasyonlarda OTA standart çözeltileri.....	47
Çizelge 4.1 : HPLC OTA analizi kalibrasyon grafiği verileri.....	53
Çizelge 4.2 : LOD ve LOQ değerleri için gerekli veriler.....	53
Çizelge 4.3 : <i>A.carbonarius</i> suşunun örneklerine ait OTA miktarları.....	55
Çizelge 4.4 : <i>A.niger</i> suşunun örneklerine ait OTA miktarları.....	56
Çizelge 4.5 : <i>A.niger</i> suşunun geliştiği besiortamlarındaki 10 günlük pH değerleri.....	58
Çizelge 4.6 : <i>A.carbonarius</i> suşunun geliştiği besiortamlarındaki 10 günlük pH değerleri.....	59
Çizelge 4.7 : 10 günlük inkubasyon periyodunda koloni çapları değerleri.....	60

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Sorpsiyon izotermi genel gösterimi.	13
Şekil 2.2 : Mikroorganizma gelişmesine ait fazlar.	22
Şekil 2.3 : OTA'nın kimyasal yapısı.	29
Şekil 2.4 : Standart bir HPLC cihazının bileşenleri.	39
Şekil 4.1: Thoma lamı sayımında sayım yapılan bölgeler.	49
Şekil 4.2: HPLC OTA analizine ait kalibrasyon grafiği.	52
Şekil 4.3 : <i>A.niger</i> suşunun 3 farklı besiortamındaki OTA profilleri.	57
Şekil 4.4 : <i>A.carbonarius</i> suşunun 3 farklı besiortamındaki OTA profilleri.	57
Şekil 4.5 : <i>A.niger</i> suşu gelişimi sırasında pH değişimlerinin zamana karşı grafiği.	58
Şekil 4.6 : <i>A.carbonarius</i> suşu gelişimi sırasında pH değişimlerinin zamana karşı grafiği.	59
Şekil 4.7 : <i>A.niger</i> suşunun 25°C ve 30°C'lik iki farklı sıcaklık değerindeki gelişimi.	61
Şekil 4.8: <i>A.carbonarius</i> suşunun 25°C ve 30°C'lik iki farklı sıcaklık değerindeki gelişimi.	62

SİYAH *Aspergillus* SUŞLARI TARAFINDAN KURU ÜZÜM BESİYERİNDE OKRATOKSİN A (OTA) OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ

ÖZET

Tüketiciler, sebze ve meyveleri yaş formda olarak tüketebildikleri gibi, kurutulmuş formda da tüketebilmektedirler. Kurutulmuş olarak tüketilen ürün gruplarından birisi de kuru üzümlelerdir. Kuru üzümleler çekirdekli olabildiği gibi çekirdeksiz de olabilir. Yaş formdaki üzümleler geleneksel ya da modern teknikler kullanılarak kurutma prosesinden geçirilerek kurutulmuş forma getirilir. Kuru üzüm gerek iç piyasaya sürülmesi, gerekse ihracat ürünü olması nedeniyle ekonomik açıdan önem teşkil eden bir gıda maddesi grubudur. Kuru üzüm, bağlarda yetismeye başladığı yaş halinden itibaren tüketicilere son ürün olarak sunulup, tüketiciler tarafından tüketildiği ana kadar geçen süreçte ürünün uygun üretim ve muhafaza koşulları sağlanmadığı takdirde, mikotoksin içeriği bakımından riskli bir hale gelmektedir. Gıda endüstrisinde, gıda maddelerinin güvenliğinin ve kalitesinin sağlanması en önemli konulardan birisidir. Gıda maddelerinde mikotoksin oluşumu da, mikotoksinlerin hem insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri hem de ekonomik kayıplara neden olması açılarından, gıda güvenliği ve gıda kalitesini doğrudan etkilemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında; tüketiciler tarafından sıklıkla tercih edilen bir gıda maddesi olan kuru üzümde okratoksin A (OTA) oluşumu incelenmiştir.

Çalışmada, kuru üzümde gelişen 2 farklı *Aspergillus* suşunun (*A.niger* ve *A.carbonarius*) 10 günlük inkubasyon periyodunda 3 farklı besiortamında OTA oluşturma profilleri, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi–High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ile belirlenmiş olup; oluşan OTA miktarları tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan 2 *Aspergillus* suşu, kuru üzümde izole edilmiştir. Besiortamları ise; Malt Extract Agar (MEA), çekirdekli siyah üzümde elde edilen besiortamı ve çekirdeksiz sarı üzümde elde edilen besiortamı olup, 3 farklı çeşit besiortamı kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre; *A.carbonarius* suşunun hem çekirdekli siyah kuru üzümde hem de çekirdeksiz sarı kuru üzümde OTA oluşturduğu; *A.niger* suşunun ise her iki kuru üzüm cinsinde OTA oluşturmadığı bulunmuştur. Besiortamlarının 10 günlük gelişme periyodu boyunca pH değerleri ölçülmüş ve besiortamlarına (substrata) ait pH değerlerinin 1.günden 10.güne giderek azaldığı tespit edilmiştir. 2 farklı *Aspergillus* suşunun (*A.niger* ve *A.carbonarius*) gelişme hızlarının belirlenmesi amacıyla 10 günlük gelişme periyodu boyunca 25°C ve 30°C sıcaklık değerlerindeki, petrilerde gelişen kolonilerin çapları mm cinsinden ölçülmüştür. Çalışmada kullanılan her iki *Aspergillus* suşunun da 30°C sıcaklık değerindeki gelişmelerinin daha hızlı olduğu bulunmuştur.

Bu yüksek lisans tezinin birinci bölümünde giriş bilgileri; ikinci bölümünde literatür özeti; üçüncü bölümünde kullanılan malzeme ve yöntemler; dördüncü bölümünde çalışmadan elde edilen sonuçlar ve beşinci bölümde ise sonuç ve öneriler konularında bilgi verilecektir.

INVESTIGATION OF OCHRATOXIN A (OTA) PRODUCTION BY BLACK *Aspergilli* STRAINS ON DRIED VINE FRUIT MEDIA

SUMMARY

Consumers prefer eating fruits and vegetables during their daily diet as they have high vitamin content. They may consume fruits and vegetables as either fresh or dried depending on their preference. Grapes are very popular fruits and highly consumed in Turkey. Dried vine fruits that are dried form of grapes are one group of the food products are consumed as in the dried form. Fresh form of grapes are preferred especially in summer because of higher water content in comparison to dried form while dried vine fruit is preferred especially in winter. Dried vine fruit can be either with seed or seedless.

Grapes are dried by the application of drying process. Drying process decreases the water content of the food product. Therefore, the water activity of food product is also decreased. Drying process can be applied by using either traditional techniques or modern techniques. For both methods, this is certain that the water activity is decreased. Microorganisms cannot grow or can grow limited at lower water activity values as their metabolic activity is decreased or stopped due to the limited available water. Low water activity value and other factors affect the mold metabolism negatively and this situation causes stress on mold metabolism. In this case, if the other factors are appropriate, the molds synthesize mycotoxins. Mycotoxins have not only harmful effect on human health but also negative effect economically. Dried vine fruits have high economical value since they are both sold in domestic market and exported. Dried vine fruits can become risky due to mycotoxin content if appropriate manufacturing and storage conditions are not satisfied during the period from harvest to the consumption of end product. Ensurance of food safety and food quality is one of the most important topics in food industry. Mycotoxin formation on food products, directly affect food safety and food quality since mycotoxins cause economical loss and have negative effects on human health.

There are different types of mycotoxins synthesized by different species of molds. However, the frequency and availability of mycotoxins are not the same. Some of the mycotoxins (aflatoxins, ochratoxins, fumonsins, etc.) are found frequently. That is why, they are called as major mycotoxins. Some of the mycotoxins (sterigmatocystin, 3-nitropiazonic acid, etc.) are found rarely. That is why, these types of mycotoxins are called minor mycotoxins.

In this study, one of the most frequent mycotoxins, ochratoxin A (OTA) formation in dried vine fruits that are one of the often preferred food products by consumers was investigated. In this study, the OTA production formation profiles of two *Aspergillus* strains (*A.niger* and *A.carbonarius*) during 10 days incubation period were stated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The amount of OTA that were formed during incubation period were quantified. Two *Aspergillus* strains (*A.niger* and *A.carbonarius*) used in the study were isolated from dried vine fruits. Three

different medias are used in this study and they are: Malt Extract Agar (MEA), grape media obtained from sultanas and grape media obtained from seed bearing raisins.

It was found that *A.carbonarius* strain used in this study synthesized OTA in both types of dried vine fruits that were used in this study while *A.niger* strain that was used in this study did not synthesize OTA in both types of dried vine fruits that were used in this study. pH values of medias during 10 days incubation period were measured. For *A.niger* strain, pH values of MEA were measured between 5.13–2.38; pH values of grape media obtained from sultanas were measured between 3.89–1.86; pH values of grape media obtained from seed bearing raisins were measured between 4.07–2.11. For *A.carbonarius* strain, pH values of MEA were measured between 5.13–2.18; pH values of grape media obtained from sultanas were measured between 3.89–2.05; pH values of grape media obtained from seed bearing raisins were measured between 4.07–1.83. It was determined that pH values of media have been gradually decreasing from the first day to the tenth day.

Two *Aspergillus* strains (*A.niger* and *A.carbonarius*) were incubated at both temperatures, 25°C ve 30°C, for 10 days in order to determine the growth rate of these two strains. Colony diameters were measured in terms of mm for each day during incubation period. Diameter values started from 0 mm and reached to 85 mm at the end of the incubation period. It is valid for both strains that the surface of the petri dishes was fully covered on the seventh day for 30°C incubation temperature and on the tenth day for 25°C incubation temperature. For *A.niger* strain, the growth rate at 25°C was found as 8.5595 mm/day; and the growth rate at 30°C was found as 10.067 mm/day. For *A.carbonarius* strain, the growth rate at 25°C was found as 8.7088 mm/day; and the growth rate at 30°C was found as 10.411 mm/day. These results demonstrated that the growth rate of *A.carbonarius* is higher than the growth rate of *A.niger*. In addition to this, it was found that the growth rate at 30°C was faster than the growth rate at 25°C for both *Aspergillus* strains that were used in this study.

In order to minimize the risk of OTA that has negative health effect, the producers should ensure the food safety during the period from manufacturing the food product to the consumption of the product by managing this period consciously and carefully. By this way, positive developments on food quality and food safety can be achieved.

In the first chapter of the master thesis, information for introduction; in the second chapter, literature survey will be emphasized. In the third chapter, materials and methods that have been used in the study and in the fourth chapter, results obtained from the study will be mentioned. Finally, in the last chapter, discussion part will take place.

1. GİRİŞ

Doğada bulunan canlılar taksonomi biliminden faydalanılarak sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırılmaya göre, funguslar alemine ait şubelerden birisi küflerdir. Küfler; heterotrof, filamentli ve çok hücreli canlılardır. Küflerin metabolizma faaliyetleri sonucu çok çeşitli metabolitler üretilmektedir. Bu üretilen metabolitler, oluşum miktarları kıstas alınarak, primer (birincil) metabolitler ve sekonder (ikincil) metabolitler olarak ayrılırlar. Primer (birincil) metabolitler; büyük moleküllerin (protein, yağ vb.) küçük moleküllere (yağ asidi, aminoasit vb.) parçalanması, yeni molekül sentezi gibi organizmanın canlılık faaliyetleri ile doğrudan ilişkilidir. Primer metabolitler arasında; enzim, yağ asitleri, steroller, proteinler, aromatik aminoasitler bulunmaktadır. Bu metabolitlerin haricinde küfler, primer metabolitlerden daha az miktarda sekonder (ikincil) metabolitler de sentezlemektedirler. Bu metabolitlerin; primer (birincil) metabolitlerde olduğu gibi organizmanın normal canlılık faaliyetlerine doğrudan bir etkisi bulunmamaktadır. Sekonder (ikincil) metabolitler, küfün gelişme fazlarından, logaritmik gelişme fazının sonunda üreilmeye başlar. Küflerin sekonder (ikincil) metabolitlerinden birisi, mikotoksinlerdir (Erginkaya ve Kabak, 2011). Mikotoksinler de sekonder metabolitler grubunda yer almaktadır. “Mikotoksin” sözcüğü Yunanca’da “küf” anlamına gelen “mykes” ve Latince’de “zehir” anlamına gelen “toxicum” sözcüklerinin bir araya getirilmesiyle oluşmuştur (Brera ve diğ, 2008). Toksin; bir bitki, hayvan veya mikroorganizma tarafından sentezlenen ve bir başka organizmaya zararlı etkileri olan madde olarak tanımlanabilir. Mikotoksinler ise, düşük molekül ağırlıklı (MW~700) küf toksinleridir (Turner ve diğ, 2009). Yaklaşık olarak 400 çeşit mikotoksin bilinmektedir (Sulyok ve diğ, 2010). İnsan ve hayvan sağlığı açısından toksik etkiye sahip olan mikotoksinler, her küf türü tarafından değil, bazı küf türleri tarafından sentezlenmektedir. Mikotoksin sentezleyebilen küfler; *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., ve *Fusarium* spp. cinslerinin mikotoksijenik özellik gösteren türleridir (Suanthie ve diğ, 2009). Çeşitli türler tarafından üretilen mikotoksinler major ve minor olarak, iki sınıfa ayrılabilir. Major sınıfa ait mikotoksinler; aflatoksinler, okratoksinler, trikotesenler, zearalenone, fumonisinler, patulindir. Minor sınıfa ait

mikotoksinler; ergot alkaloidleri, citrinin, cyclopiazonic asit, sterigmatocystin, moniliformin, gliotoksin, citreovinin, tremorgenic mikotoksin, penicillic asit, roquefortine, 3-nitropropionic asit, fusaproliferindir (Brera ve diğ, 2008). Bu mikotoksinlerden sıklıkla karşılaşılan ve toksik olanlar; aflatoksinler, okratoksinler, trikotesenler, zearalenone, fumonisinler ve patulindir (Sulyok ve diğ, 2010). Okratoksin A (OTA); UV ışığı altında floresans veren, renksiz, kristal yapıda bir bileşiktir. Ampirik formülü $C_{20}H_{18}O_6NCl$ şeklindedir. Organik çözücülerdeki çözünürlüğü yüksek; sudaki çözünürlüğü ise daha düşüktür. OTA üreten küf türlerine, hem *Penicillium* (*P.verrucosum*, *P.nordicum*) hem de *Aspergillus* (*A.carbonarius*, *A.ochraceus*) cinslerinde rastlanmaktadır (Ringot ve diğ, 2006). OTA insan sağlığı üzerinde; nefrotoksik, kanserojen, genotoksik, immunosupresif, teratojenik, mutajenik ve hepatotoksik etkilere sahip olup; hububatlar, şarap, üzüm, üzüm suyu, kahve, kakao, baharatlar ve kuru üzüm çeşitleri OTA açısından risklidir (Cabanas ve diğ, 2008; Zhang ve diğ, 2011). Bu nedenle gıda maddelerinin içerdiği OTA miktarı açısından hem ulusal hem de uluslararası organizasyonlar tarafından limit değerler belirlenmiştir. Avrupa Birliği'nde, gıda maddelerinin içerebilecekleri maksimum OTA miktarı, (EC) No:1881/2006 Yönetmeliği ile belirlenirken; iç piyasa ürünleri için Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne göre belirlenen limit değerler kullanılmaktadır. Bu yönetmeliğe göre; kuru üzümde bulunabilecek maksimum OTA miktarı 10 ppb (10 µg/kg) olarak belirtilmektedir (TGK, 2011).

1.1 Tezin Amacı

Bu yüksek lisans tezinin amacı: mikotoksinlerin başlıca tiplerinden olan, sıklıkla karşılaşılan ve aynı zamanda insan sağlığı açısından en riskli mikotoksinlerden birisi olan OTA'nın; kuru üzümde 2 farklı *Aspergillus* suşu (*A.niger* ve *A.carbonarius*) tarafından sentezlenmesinin karakteristiğini belirlemektir.

Bu çalışmanın literatür özeti kısmında; kuru üzüm tanımı ve özellikleri, kuru üzümün sektörel durumu, *A.niger* ve *A.carbonarius* türleri hakkında genel bilgi ve yapılan çalışmalar, OTA, HPLC ve mikroorganizma gelişmesini etkileyen faktörler ve mikrobiyal gelişme hakkında genel literatür bilgilerinden; malzeme ve yöntem kısmında çalışmada kullanılan malzemeler ve çalışmanın yürütülmesinde kullanılan çalışma yönteminden; bulgular ve tartışma kısmında inkubasyon periyodu boyunca besiyortamlarının pH değerlerinde meydana gelen değişimlerden, *A.niger* ve

A.carbonarius suşlarını içeren petrilerde gelişen suşların koloni çaplarına bağlı gelişme hızından ve OTA'nın HPLC ile analizi sonuçlarından ve son bölümde çalışma sonuçlarına dair yorumlar, öneriler ve literatürdeki çalışmalarla elde edilen sonuçların uyumluluğu konularından bahsedilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bu bölümde; kuru üzüm, *A.niger*, *A.carbonarius*, OTA, HPLC ve mikroorganizma gelişmesini etkileyen faktörler ve mikrobiyal gelişme hakkında genel bilgilerden bahsedilecektir.

2.1 Kuru Üzüm Tanımı ve Kuru Üzüm Hakkında Genel Bilgiler

Bu başlık altında; kuru üzümün ürün tanımı, tarihsel gelişimi, üzüm yetiştirilen bölgeler ve kuru üzümün sektörel durumu hakkında bilgi verilecektir.

2.1.1 Ürün tanımı

Üzüm; asmagiller (*Vitaceae*) familyasının *Vitis* cinsinde yer alan asma bitkilerinin (özellikle de *Vitis vinifera*'nın) salkım halindeki tatlı ve sulu meyvesi olarak tanımlanmaktadır. Kuzey Yarımküre'de yaygın olarak *Vitis* cinsine ait yaklaşık 60 kadar tür bulunmaktadır. Bu türler içinde en çok *V.vinifera* yetiştirilmektedir (Duran, 2003).

Türk Standartları Enstitüsü Çekirdeksiz Kuru Üzüm Standardı'na (TS 3411/Şubat 2002) göre çekirdeksiz kuru üzüm; *V.vinifera* L. türüne giren çekirdeksiz taze üzümlerin kurutulmuş meyveleri olarak tanımlanmaktadır (TSE, 2002). Kuru üzümler, hazırlanma şekillerine göre gruplara; renklerine ve iriliklerine göre tiplere; özelliklerine göre de sınıflara ayrılmaktadır. Gruplarına göre kuru üzümler; ağartılmış ve ağartılmamış (naturel) olarak iki grupta incelenmektedir. Tiplerine göre kuru üzümler; renklerine göre 7,8,9,10 ve 11 tip numaraları ile beş tipe ayrılmaktadır. Sınıflarına göre kuru üzümler; ekstra, I.sınıf, II.sınıf ve endüstriyel olmak üzere dört sınıfa ayrılmaktadır. Boyları kıstas alınarak kuru üzümler iriliklerine göre; çok iri, standart, orta, küçük ve çok küçük olarak beş boyda ayrılmaktadır (TSE, 2002).

Kuru üzüm çeşitleri arasında; frenk üzümü, sultani, İzmir üzümü, Thompson üzümü gibi çekirdeksiz kuru üzümler olduğu gibi; Muscatel, Malaga, Denia, Damascus, Lexire ve Gordo gibi iri ve çekirdekli kuru üzümler de mevcuttur (Duran, 2003).

2.1.2 Üzüm ve kuru üzümün tarihsel gelişimi

Jeolojik dönemlere ait kalıntılar incelendiğinde bu dönemlerde de asmaların bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu bilgiden hareketle bağcılığın, insanlık tarihi kadar eski olduğu düşünülmektedir (Duran, 2003).

Mısır hiyerogliflerinde, üzüm ve şarap üretimine ait ayrıntılı betimlemeler bulunmaktadır. Homeros Dönemi'nde Yunanlılar arasında önemli bir meta olan üzüm M.Ö. 600'de Fenikeliler tarafından Fransa'ya getirilmiş, M.S. 2. yüzyıl dolaylarında Romalılar tarafından Ren Vadisi'nde yetiştirilmeye başlamıştır. Asma tarımının Batı'ya doğru yayıldığı dönemde, aynı dönemde üzüm Hindistan yoluyla Uzakdoğu'ya da götürülmüştür. Böylece tüm dünyaya yayılan üzüm, uygun iklim koşullarının sağlandığı her yerde yaygın biçimde yetiştirilmeye başlanmıştır (Duran, 2003).

Bağcılık açısından yerkürenin en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz, asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra son derece eski ve köklü bir bağcılık kültürüne de sahiptir. Anadolu'da bağcılık kültürünün tarihi oldukça eski olup; yapılan arkeolojik kazılardan Anadolu'da bağcılık kültürünün M.Ö. 3500 yılına dayandığı saptanmıştır. Ülkemizin değişik yörelerinde yapılan arkeolojik kazılardan çıkarılan tarihi eserlerde üzümle ilgili şekil ve kabartmaların yer alması, o yörede bağcılık kültürünün yaygın olduğunu gösteren önemli bulgulardır. Yapılan kazılarda bağcılıkla ilgili tarih öncesi devirlere ait önemli eserler bulunmuştur (Duran, 2003).

2.1.3 Türkiye'de üzüm yetiştirilen bölgeler ve kuru üzüm çeşitleri

Türkiye, Dünya bağ alanı arasında 4. sırada yer alıp; Doğu Anadolu'nun yüksek kesimleri ile Doğu Karadeniz sahil şeridi dışında kalan tüm tarım alanlarında bağcılık yapılabilmektedir. Tarım bölgelerinde bağ alanları ve üzüm üretim miktarları dikkate alındığında ilk sırada Ege Bölgesi yer almaktadır. Ege Bölgesi, Türkiye'de pazara dönük işletmelerin yoğun olduğu en önemli bağ bölgesidir. Ülkemizde yetiştirilen çekirdeksiz kuru üzümün tamamına yakını bu bölgemizde yetiştirilmektedir. Türkiye bağ alanlarının %28.5'ini ve üretimin %46'sını bu bölge toprakları oluşturmaktadır. Bölgenin orta kesiminde yer alan Gediz vadisinde çoğunlukla çekirdeksiz üzüm bağları bulunmaktadır. Yörede %90 oranında yuvarlak çekirdeksiz üzüm yetiştirilmektedir. Üretimin geriye kalan çeşidini ise sultani çekirdeksiz üzüm çeşidi oluşturmaktadır. Bölgenin orta kesiminde sofralık olarak

razakı ve ipek, kuzey kesiminde Bozcaada çavuşu, Kozak beyazı, Kozak siyahı ve Amasya, doğousunda ise Işıklı, Burdur Dimriti, Pembe ve Siyah Germe ön plana çıkan çeşitlerdir. Ayrıca Akhisar yöresinde şaraplık üzüm de yetiştirilmektedir (Duran, 2003).

Türkiye’de yetiştirilen başlıca sofralık üzüm çeşitleri: çavuş, kokulu çavuş, pembe çavuş, çekirdeksiz sultani, Tarsus beyazı, razakı, Erenköy beyazı, Erenköy siyahı, Kozak beyazı, Kozak siyahı, künefi, Muhammediye ve Adana karasıdır. Kuru üzüm çeşitleri ise; çekirdeksiz sultani, razakı, yuvarlak çekirdeksiz, siyah dirmet, irikara, dökülgen, besni ve tahannebir şeklindedir (Duran, 2003).

Dış ticarete kullanılan ve genellikle kurutularak değerlendirilen çekirdeksiz üzüm hasadı Ağustos ayında başlayıp, Eylül ayında sona ermektedir. Türkiye’de çekirdeksiz kuru üzüm üretimi esas olarak Ege Bölgesi’nde yoğunlaşmıştır. Özellikle Manisa, Turgutlu, Salihli, Akhisar, Menemen, Kemalpaşa, Çal ve Çivril’de üretilmektedir. Dış ticarete kullanılan çekirdeksiz kuru üzüm üretiminde Ege Bölgesi illerinden Aydın, Manisa ve İzmir ilk sıralarda yer almaktadır. Bölgelere göre yapılan üretimler incelendiğinde; Ege Bölgesi’nde çekirdeksiz kuru üzüm, Marmara Bölgesi’nde sofralık ve şaraplık, Akdeniz Bölgesi’nde ilk turfanda, Orta Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde şaraplık, şıralık, sofralık, çekirdekli kurutmalık üzüm yetiştiriciliğinin gelişme gösterdiği görülmektedir. Üretilen üzümlerin değerlendirilme payları yaklaşık olarak şu şekildedir: %30 sofralık, %35 kurutmalık, %30 pekmez, pestil, sucuk, şıra ve %5 şaraplık (KGM, 2014).

2.1.4 Kuru üzümün sektörel durumu

Türkiye, Dünya’da en büyük çekirdeksiz kuru üzüm üreticisi ve ihracatçısı konumunda olup; dünya çekirdeksiz kuru üzüm ihracatının %40–45’ini gerçekleştirmektedir. Türkiye’de üretilen üzümün yaklaşık 2/3’si çekirdekli, 1/3’i ise çekirdeksiz üzümünden oluşmaktadır. Çekirdeksiz üzüm, Türkiye’nin ihracata yönelik üretilen üzümleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Türkiye üzüm ihracatının %95’ini sultani çekirdeksiz üzüm oluşturmaktadır. Üretilen sofralık yaş üzüm Rusya, Almanya başta olmak üzere Avrupa Birliği ülkelerine ihraç edilmektedir (KGM, 2014).

Dünya çekirdeksiz kuru üzüm üretimi 650–1300 bin ton civarında gerçekleşmektedir. Ülkelere göre dünyada çekirdeksiz kuru üzüm üretim miktarları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir (KGM, 2014).

Çizelge 2.1 : Dünya çekirdeksiz kuru üzüm üretim miktarları (bin ton).

Ülkeler	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015
Türkiye	310	270	249	269	310	186	328
A.B.D.	255	243	259	270	148.27	305	276
İran	50	100	135	135	135	125	145
Şili	50	64	60	62	83	65	55
Arjantin	26	28	30	40	26	29	27
Güney Afrika	28	17	29	19	19.2	35	46
Avustralya	9	14	12	5	10.6	15	13
Yunanistan	-	5	5	5	5	5	5
Çin	Veri yok	Veri yok	130	120	150	150	180
Hindistan	Veri yok	Veri yok	120	135	125	145	105
Özbekistan	Veri yok	Veri yok	25	25	25	25	25
TOPLAM	728	741	1053	1085	1129.07	1142	1205

Çekirdeksiz kuru üzüm üretiminde iklim koşullarına bağlı olarak zaman zaman büyük azalmalar veya artışlar da olabilmektedir. Çizelge 2.1’deki 2012/2013 dönemine ait verilere göre, dünya üretiminin %27.45’ini Türkiye gerçekleştirmektedir. Türkiye’yi %21.99 oranla A.B.D, %13.29 oranla Çin, %11.96 oranla İran ve %11.07 oranla Hindistan izlemektedir (KGM, 2014).

Türkiye, ABD, Yunanistan, İran, Afganistan gibi kuzey yarım küre üretici ülkelerinin hasat dönemi Ağustos ve Eylül aylarıdır. Avustralya ve Güney Afrika gibi güney yarım küre ülkelerinin hasat dönemi ise Mart ayından itibaren başlamaktadır (KGM, 2014).

Dünya çekirdeksiz kuru üzüm üretiminde Türkiye ilk sırada bulunmaktadır. Bağ alanı ve üretim miktarı açısından Ege Bölgesi’nden sonra Akdeniz Bölgesi ikinci sırada yer almaktadır. Üçüncü sırada Güneydoğu Anadolu Bölgesi bulunmaktadır. Üzümün en az yetiştirildiği bölgeler ise Karadeniz Bölgesi ve Doğu Anadolu Bölgesi’dir. Çizelge 2.2’de Ege Bölgesi’ne ait çekirdeksiz kuru üzüm bağ alanları ve Türkiye üretim miktarları gösterilmiştir. Bağ alanlarının genişlemesinin yanı sıra verimde de önemli artışlar olmuştur. Söz konusu karşılaştırılan dönemlerde üretimde 2002 yılından bu yana dönemler itibariyle artış ve azalışlar meydana gelmiştir (KGM, 2014).

Çizelge 2.2 : Ege Bölgesi çekirdeksiz kuru üzüm bağ alanları ve üretim miktarları.

Yıl	Alan (bin dekar)	Üretim Miktarı (bin ton)
2002/2003	794.2	231
2003/2004	812.1	215
2004/2005	820.9	305
2005/2006	850.8	225
2006/2007	861.6	256
2007/2008	834.4	244
2008/2009	850.8	349
2009/2010	849.7	275
2010/2011	849.7	248.5
2011/2012	849.7	256.6
2012/2013	852.6	310
2013/2014	967.6	186
2014/2015	983.5	328.1

Dünyada son 5 yılda üretilen çekirdeksiz kuru üzümün yaklaşık % 50-70’lik kısmı uluslararası ticarete konu olmakta, kalan kısmı üretici ülkelerin kendi iç piyasalarında tüketilmektedir. Üretici ülkelerin iç tüketimleri 100-400 bin ton civarında seyretmektedir. Uluslararası ticarete konu olan 500–600 bin ton ürün miktarına, iç tüketimlerinin eklenmesiyle toplam dünya çekirdeksiz kuru üzüm tüketimi 650–1000 bin ton seviyelerinde gerçekleşmektedir (KGM, 2014).

Çekirdeksiz kuru üzüm iç piyasada tüketim miktarı 35–50 bin ton seviyesindedir. Çizelge 2.3’te yıllara göre dünya tüketimi ve Türkiye tüketimi miktarları gösterilmiştir (KGM, 2014).

Çizelge 2.3 : Çekirdeksiz kuru üzüm tüketim miktarları.

Yıl	Dünya Tüketimi (bin ton)	Türkiye Tüketimi (bin ton)
2008/2009	728	41
2009/2010	741	40
2010/2011	1053	35
2011/2012	1085	50
2012/2013	1223	45
2013/2014	1234	52
2014/2015	1293	50

Türkiye kuru üzüm ihracatında; dünya ticaretinin yarısına yakınına sahip olup; yıllık 300–500 milyon dolar gelir elde etmektedir. Bu bağlamda çekirdeksiz kuru üzüm, en önemli ihracat ürünleri arasında yer almaktadır. Türkiye çekirdeksiz kuru üzüm ihracat miktarları ve toplam ihracatın üretim içindeki payı Çizelge 2.4’te gösterilmiştir (KGM, 2014).

Çizelge 2.4 : Türkiye çekirdeksiz kuru üzüm ihracat durumu.

Yıl	Üretim Miktarı (bin ton)	İhracat Miktarı (bin ton)	İhracatın Üretime Oranı (%)
2002/2003	210	207	98.6
2003/2004	200	193	96.5
2004/2005	250	238	95.2
2005/2006	220	200	90.9
2006/2007	276	266	96.4
2007/2008	225	195	86.7
2008/2009	310	274	88.4
2009/2010	270	207	76.7
2010/2011	249	205	82.3
2011/2012	269	197	73.2
2012/2013	310	246	79.4
2013/2014	186	182.6	98.1
2014/2015	328	72.5	22

Türkiye'nin en önemli ihracat ürünleri arasında olan çekirdeksiz kuru üzümün, tarım ve ticaretinin geliştirilmesi ve sektörün sorunlarının giderilmesi son derece önemlidir. Bu konuda üretim ve kurutma koşullarının kontrol altında olmasının sağlanması, üretimin bilinçli olarak yapılarak ürün kalitesinin artırılması, üründe kalıntı problemlerinin engellenmesi gibi noktalar özellikle dikkat edilmesi gereken noktalardır (KGM, 2014).

2.2 Mikroorganizma Gelişmesini Etkileyen Faktörler

Bu bölümde mikroorganizma gelişmesini etkileyen faktörler hakkında bilgi verilecektir.

Gıda maddelerinde mikroorganizmaların gelişmesini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler; gıda maddesinin cinsine, gıda maddesinin içinde bulunduğu ortamın özelliklerine, mikroorganizmanın türüne, gıda maddesine uygulanan proseslere bağlı olarak farklılık gösterir. Gıda maddesinde mikroorganizma gelişmesi; istenmeyen tat, koku, renk, yapı ve görünüş gibi ve bozulma olarak tanımlanan değişikliklere yol açabilmektedir. Gıda maddesinde meydana gelen bu değişikliklerden bir tanesi olabileceği gibi aynı anda tümü de oluşabilir (Heperkan, 2011).

Mikroorganizmaların gelişmesini etkileyen faktörlerin tamamı; gıda maddelerinin mikrobiyal faaliyetlere karşı korunmasına yönelik geliştirilen proseslerin parametrelerine ilişkin bilgileri de içermektedir. Böylece gıda koruma prosesleri

ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, mikroorganizmaların gelişmesini etkileyen her faktör, aynı zamanda mikroorganizma gelişmesini önleyen engeller (hurdles) olarak da değerlendirilebilir. Ancak her faktörün etkisi her durumda aynı değildir. Sıcaklık, su aktivitesi gibi temel faktörler; asitlik, redoks potansiyeli gibi yardımcı faktörlerle kombine edilerek gıda maddelerinin mikrobiyolojik stabilizasyonu sağlanmaktadır (Heperkan, 2011).

Gıda maddelerinde mikroorganizma gelişmesini etkileyen faktörler; iç faktörler (intrinsic factors), çevresel faktörler (environmental factors), mikroorganizmaların birbirleriyle etkileşimleri (implicit factors) ve proses faktörleri (process factors) olmak üzere 4 başlıkta incelenmektedir (Pazlarova, n.d.). Gıda maddelerinin mikroorganizma gelişmesini etkileyen iç faktörler şunlardır: su aktivitesi (a_w), pH ve asitlik, redoks potansiyeli (E_h), besin maddeleri, antimikrobiyal bileşenler ve yapılar, biyolojik yapılar, rekabetçi mikroflora, ozmotik basınç şeklindedir (Pazlarova, n.d.; FDA, 2001; Arda, 2000). Çevresel faktörler; bağıl nem, sıcaklık ve süre, ortam atmosferinin gaz bileşimi olarak incelenmektedir. Mikroorganizma etkileşimlerine ait faktörler; spesifik gelişme hızı, sinerjizma, antagonizma ve kommensalizm şeklindedir. Mikroorganizma gelişmesini etkileyen faktörler sınıflandırmasına ait başlıklardan birisi olan proses faktörleri olarak değerlendirilen faktörler şunlardır: dilimleme, yıkama, ambalajlama, ısınlama, pastörizasyon ve sterilizasyondur (Pazlarova, n.d.).

2.2.1 Su aktivitesi (a_w)

Gıda maddelerinde karbonhidrat, yağ, protein, vitamin ve minerallere ek olarak su bileşeni de büyük önem taşımaktadır. Gıda maddelerindeki su, gıdanın yapısına bağlı olarak biyokimyasal ve mikrobiyolojik reaksiyonların birçoğunda rol oynamaktadır. Mikroorganizmaların gelişmeleri ve metabolik aktiviteleri, ortamdaki suyun kullanılabilir formda bulunmasına bağlıdır. Gıda maddelerinde suyun niteliğini belirlemek üzere, sorpsiyon izotermi ve su aktivitesi olmak üzere iki önemli terim kullanılmaktadır. Su aktivitesi kavramı şu şekilde tanımlanmaktadır: gıda maddesindeki suyun buhar basıncının aynı sıcaklıktaki saf suyun buhar basıncına oranı veya gıdaların atmosferden aldığı veya verdiği suyun bağıl nem dengesinin 1/100'i su aktivitesi olarak tanımlanmaktadır (Ayhan, 2000). Gıda mikrobiyolojisi açısından su aktivitesi ise; gıda maddesinin yüzeyinde serbest halde bulunan ve

mikroorganizmalar tarafından kullanılabilen su olarak tanımlanmaktadır. Su aktivitesi, a_w sembolü ile gösterilmektedir. 1880’li yıllarda Fransız kimyacı François-Marie Raoult tarafından, bir maddenin çözeltide çözündüğünde, çözeltinin buhar basıncının genellikle düştüğü bulunmuştur. Bu gözlem; çözünen miktarın mol fraksiyonuna ve saf (orijinal) çözeltinin buhar basıncına bağlıdır. Raoult Kanunu eşitliği, denklem 2.1 ile gösterilmiştir (Larsen, n.d.).

$$\text{Raoult Kanunu: } P_{\text{çözelti}} = x_{\text{çözücü}} * P_{\text{çözücü}} \quad (2.1)$$

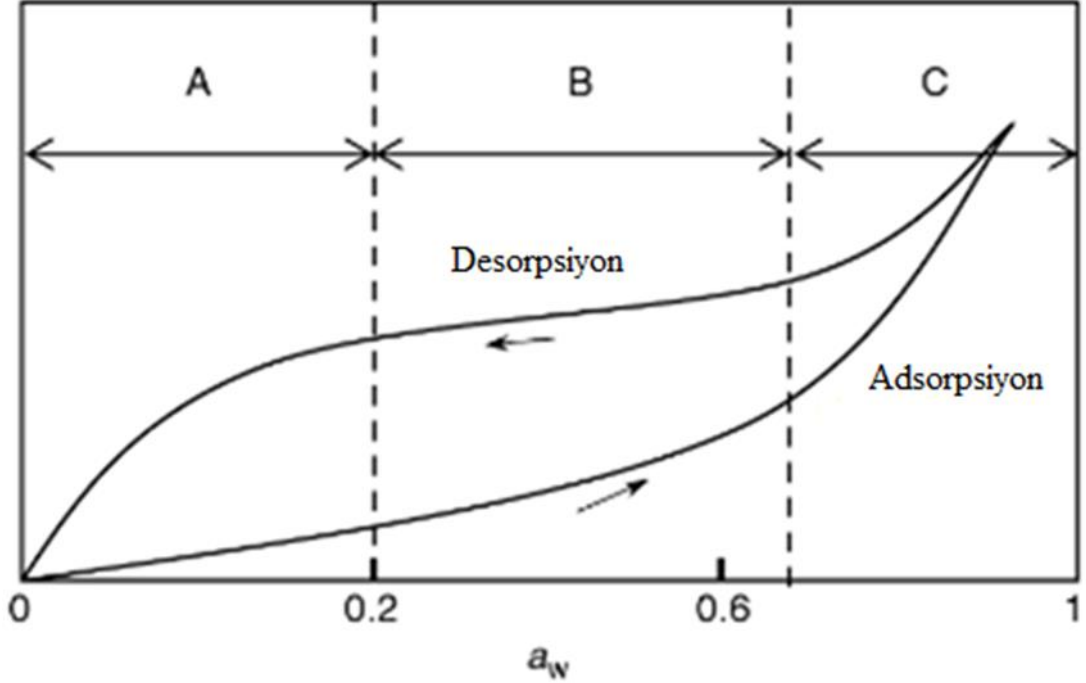
Denklem 2.1’de; $P_{\text{çözelti}}$, çözeltinin buhar basıncını; $P_{\text{çözücü}}$, aynı sıcaklıktaki saf çözücünün buhar basıncını ve $x_{\text{çözücü}}$, çözünen maddenin mol fraksiyonunu göstermektedir (Larsen, n.d.). Raoult Kanunu’nun, su aktivitesi kavramına uyarlanmış eşitliği denklem 2.2 ile gösterilmiştir (Ayhan, 2000).

$$\text{Su aktivitesi } (a_w): a_w = P/P_o \quad (2.2)$$

Denklem 2.2’de; a_w , su aktivitesini; P , gıda maddesindeki suyun buhar basıncını ve P_o , aynı sıcaklıktaki saf suyun buhar basıncını göstermektedir (Ayhan, 2000). Örneğin su aktivitesinin $a_w=0.80$ olması, gıda maddesindeki suyun buhar basıncının, saf suyun aynı sıcaklıktaki buhar basıncının %80’i olduğu anlamına gelmektedir. Su aktivitesi ve sıcaklık birbirleriyle orantılı olup, su aktivitesi sıcaklıkla yükselir (FDA, 2015).

Gıda maddelerinin nem içeriğine karşı su aktivitesi (a_w) grafiği çizilerek sorpsiyon izotermi elde edilir. Çoğu gıda maddesinin sorpsiyon izotermi lineer olmayıp sigmoidal yapıdadır. Gıda maddelerindeki izoterm, gıda maddesinin numunelerinin farklı sabit bağıl nem koşullarında tutulmasıyla elde edilmektedir. Dengeye ulaşıldıktan sonra örnekteki su içeriği gravimetrik olarak ya da diğer metotlarla tayin edilir. Sabit bağıl nem tuz çözeltileri kullanılarak elde edilmektedir. Kuru maddenin, artan su aktivitesine karşı maruz bırakılmasıyla elde edilen izoterm, adsorpsiyon izotermi; yaş maddenin azalan su aktivitesine karşı maruz bırakılmasıyla elde edilen izoterm, desorpsiyon izotermi olarak adlandırılır. Bir başka deyişle adsorpsiyon eğrisi gıda maddesinin nem kazanmasını; desorpsiyon eğrisi ise gıda maddesinin nem kaybetmesini temsil etmektedir. Gıda maddelerinin genel sorpsiyon izotermi Şekil 2.1’de gösterilmiştir (Ratti, 2009). Adsorpsiyon izotermi gıda maddelerinin hidroscobik özelliklerini belirlemek için kullanılırken; desorpsiyon izotermi gıda maddelerinin kurutma prosesi sırasında nem miktarı düştüğü için bu

proseste faydalıdır (Ratti, 2009). Gıda maddelerinin adsorpsiyon prosesi ve desorpsiyon prosesi sırasında birebir olarak aynı yoldan ilerlemedikleri Şekil 2.1’deki grafikte görülmektedir.



Şekil 2.1 : Sorpsiyon izotermi genel gösterimi.

Şekil 2.1’de gösterilen bir gıda maddesinin sorpsiyon izotermine ait genel gösterimde A, B ve C olmak üzere 3 bölge bulunmaktadır. A bölgesinde su molekülleri güçlü bir şekilde bağlı olup; su çözücü olarak değerlendirilememektedir. Bu bölgedeki suyun buharlaşma entalpisi, saf suyunkinden daha yüksektir. B bölgesinde su molekülleri daha gevşek olarak bağlı olup; suyun bir kısmı sıvı fazdadır; ancak mobilitesi sınırlıdır. C bölgesinde su molekülleri çok daha gevşek olarak bağlıdır ve reaksiyonlara çözücü olarak katılabilmeye uygundur. Şekil 2.1’de gösterilen gıda maddelerinin sorpsiyon izotermi, adsorpsiyon ve desorpsiyon sırasındaki reaksiyonun izlediği yolun farklı olduğu görülmektedir. Gıdanın nem alması ve kaybetmesi sırasında görülen bu farklılık “histeresis” olarak tanımlanmaktadır (Ratti, 2009). Histeresis; sıcaklık, gıda maddesinin durumu, sorbat ve sorbentin özellikleri, süre gibi faktörlere bağlıdır (Yang ve diğ., 1997). Aynı su aktivitesi değerinde; desorpsiyon prosesinde, adsorpsiyon prosesine oranla daha yüksek nem içeriği elde edilmektedir (Ratti, 2009). Bu nedenle gıda maddelerinin mikrobiyolojik stabilitelerinin sağlanmasında; su aktivitesinin adsorpsiyon ile ayarlanması daha önemlidir.

Gıda maddelerinin çoğunun su aktivitesi değeri $a_w \geq 0.95$ değerindedir. Bu değer; bakteriler, mayalar ve küflerin gelişmeleri için uygundur (FDA, 2015). Genel olarak bakteriler küflerden, Gram (-)'ler Gram (+)'lerden daha yüksek su aktivitesinde gelişme gösterirler. *A.niger* küfünün gelişme gösterdiği minimum su aktivitesi $a_w=0.78$ 'dir. Genel olarak *Aspergillus* cinsi için minimum değer $a_w=0.77-0.78$ civarındadır (Ayhan, 2000).

2.2.2 pH ve asitlik

Mikroorganizmaların gelişmesini etkileyen faktörlerden birisi de pH'dır. Gıda maddelerinin asitliğini; fermentasyonla veya zayıf asit ekleme yollarından birisinin tercih edilerek gıda maddesinin korunması eski zamanlardan beri kullanılan bir metottur. Doğal yapıları gereği, gıda maddelerinin bir kısmı daha düşük oranda asidik, bir kısmı daha asidik, çok az bir kısmı ise alkalidir. Balık, et, sebze gibi gıdalar daha düşük oranda asidik özellik gösterirken; meyvelerin çoğu daha asidik karakterdedir. Yumurta akı gibi çok az gıda maddeleri ise alkali özelliktedir. pH değeri; bir çözeltideki bulunan hidrojen iyonunun (H^+) konsantrasyonunun $-\log$ fonksiyonudur. pH değerine ait formül denklem 2.3 ile gösterilmiştir (FDA, 2001).

$$pH = -\log_{10} [H^+] \quad (2.3)$$

Gıda maddelerinin asitliğinin değerlendirilmesinde pH değerine ek olarak, asitlik iyonlaşma katsayısı olan pKa da faydalı bir terimdir. pKa, bir asidin iyonlaşma durumunu tanımlamaktadır. Denge konumunda, pKa, iyonlaşan ve iyonlaşmadan kalan asit konsantrasyonlarının birbirine eşit olduğu pH değeridir. Kuvvetli asitler çok düşük pKa değerine sahiptir. Bu durum çözelti içindeki asidin hemen hemen tamamının iyonlaştığı anlamına gelmektedir. Örneğin, 25°C'de 0.1M HCl çözeltisinin pH değeri 1.08 iken; 0.1M asetik asidin pH değeri 2.6'dır. Bu karakteristik durum, gıda maddelerinin asitlik kullanılarak korunması konusunda çok önem teşkil etmektedir. Organik asitler, iyonlaşmamış konumdayken koruyucu olarak daha etkindirler. Gıda maddesinin pH değerinin düşürülmesi, organik asidin koruyucu olarak etkinliğini yükseltmektedir (FDA, 2001).

Salata sosları gibi bazı gıda maddelerinin mikrobiyal stabiliteleri için titrasyon asitliği kavramı, pH kavramından daha iyi bir indikatördür. Titrasyon asitliği; asit çözeltisini nötralize etmek için gerekli olan standart baz çözeltisinin (genellikle 0.1M NaOH) miktarıdır. Titrasyon sırasında çözeltide iyonlaşmamış olan Hidrojen

iyonlarının miktarı ölçülmektedir. Özellikle asitliği yüksek gıda maddeleri için titrasyon asitliği önemli bir indikatördür. Organik asitler gibi zayıf asitler genellikle iyonlaşmadıkları için pH değerini doğrudan etkilemezler. Bu nedenle, titrasyon asitliği toplam asit konsantrasyonunu ölçebilirken, pH ölçümü ile bu gerçekleşmemektedir (FDA, 2001).

Mikroorganizmaların gelişmelerinde minimum, optimum ve maksimum pH değerleri bulunmaktadır. Bu değerler mikroorganizmalara göre değişmekte olup; bakteri, küf ve mayalar için minimum, optimum ve maksimum pH değerleri aralıkları Çizelge 2.5'te gösterilmiştir (Ayhan, 2000).

Çizelge 2.5 : Bakteri, maya ve küflerin gelişebildikleri pH değerleri.

Mikroorganizma	Minimum pH	Optimum pH	Maksimum pH
Bakteri	4.5	6.5–7.5	9.0
Küf	1.5–3.5	4.5–6.8	9.0–11.0
Maya	1.5–3.5	4.0–6.5	8.0–8.5

Çizelge 2.5'te görüldüğü gibi küfler geniş pH aralığında gelişme göstermektedir.

pH faktörü, diğer faktörlerle kombine edilerek gıda maddelerinde mikrobiyal gelişim inhibe edilmektedir. pH; su aktivitesi (a_w), tuz, sıcaklık, redoks potansiyeli (E_h) ve koruyucu maddeler kullanılarak gıda maddelerinde patojenlerin ve diğer mikroorganizmaların gelişimi inhibe edilmektedir. Gıda maddelerinin pH değeri, gıda maddelerine uygulanan ısıtılmanın etkinliğinde önemli bir etkiye sahiptir. pH'nın düşük olduğu gıdalarda, mikroorganizmanın direnci daha düşük olduğu için daha az ısı uygulamasıyla mikroorganizmalar inhibe edilebilmektedir (FDA, 2001).

2.2.3 Redoks potansiyelin etkisi (E_h)

Mikroorganizmaların gelişmesini etkileyen faktörlerden birisi redoks potansiyel etkisi olup; E_h ile sembolize edilmektedir. Redoks potansiyeli milivolt (mV) olarak; elektrometrik veya kolorimetrik metotlarla ölçülmektedir (Arda, 2000).

Mikroorganizmalar gelişme ortamlarındaki oksidasyon–redüksiyon (redoks) potansiyeline karşı değişik derecelerde duyarlılık göstermektedir. Herhangi bir substratın redoks potansiyeli, substratın elektron kazanma veya elektron kaybetme yolunda gösterdiği eğilim şeklinde tanımlanabilir. Bir element veya bileşik elektron kaybettiğinde substrat yükseltgenir ve bu durum oksidasyon olarak adlandırılır; elektron kazandığında ise indirgenir ve bu durum redüksiyon olarak adlandırılır.

Elektronlarını kolayca verebilen substrat iyi bir indirgeyici; kolay elektron kazanan substrat ise iyi bir yükseltgeyicidir. Elektronlar bir bileşikten diğerine aktarıldığında bu iki bileşik arasında potansiyel bir fark oluşur. Madde ne kadar indirgendiye o kadar negatif elektrik potansiyeli; ne kadar okside olduysa o kadar pozitif elektrik potansiyeli gösterecektir. Yükseltgeyici (oksidant) ve indirgeyici (redüktant) konsantrasyonları birbirine eşit elektrik potansiyeli sıfırdır. Aerobik mikroorganizmalar gelişmek için pozitif E_h değerlerine ihtiyaç duyarken; anaerobik mikroorganizmalar ise negatif E_h değerlerine ihtiyaç duyarlar. Gıda maddelerinin redoks potansiyeli; gıda maddesinin kendine özgü redoks potansiyeli, gıdanın bu potansiyelde meydana gelecek değişimlere karşı gösterdiği direnç (denge kapasitesi), gıda maddesinin çevresindeki atmosferin oksijen gerilimi, gıdayı çevreleyen atmosferin gıda içine girebilme oranı özelliklerine bağlı olarak belirlenmektedir. Gıda maddelerinin E_h değerleri genellikle +400mV ile -400mV arasında değişmektedir. Mikroorganizmaların bazıları gelişmeleri için negatif; bazıları ise pozitif E_h değerlerine ihtiyaç duyarlar. Örneğin; meyve sularının E_h değerleri +300mV ile +400mV arasındadır. Buna göre bu ürün gruplarında bozulmadan daha çok aerobik bakteriler ve aerobik küfler sorumludur (Ayhan, 2000).

2.2.4 Besin maddeleri

Mikroorganizmalar metabolik faaliyetlerini sürdürmek ve gelişmek için temel besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Gerekli besin maddelerinin tipi ve miktarı, mikroorganizmanın cinsine ve türüne bağlı olarak değişiklik gösterir (FDA, 2001). Gıda kaynaklı mikroorganizmaların çoğu; büyük moleküllü bileşiklerini monomerlerine indirgeyecek enzimlerinin olmayışı nedeniyle, enerji kaynağı olarak, şeker, alkol, aminoasit gibi bileşenleri kullanır. Çok az sayıda mikroorganizma, nişasta ve selüloz gibi kompleks karbonhidratları basit şekerlere parçalayabilirler. Aynı şekilde yağ molekülleri, proteinler de yağ asitleri ve aminoasitlere oranla daha az mikroorganizma tarafından parçalanabilir. Doğal gıdaların çoğunda temel besin maddeleri mikroorganizmaların ihtiyacını karşılayabilecek kadar bulunmaktadır. Genel olarak Gram (+) bakteriler bu bileşiklerini sentezleyemedikleri için bu maddeleri gelişme ortamından alırlar. Gram (-) bakteriler ve küfler ise bu maddelerin çoğunu sentezleyebilmektedir. Bu durumda meyvelerin pH'larının düşük, E_h değerlerinin (+) olmasına ek olarak besin maddeleri özelliği olarak da değerlendirildiğinde küflerin bakterilerden daha fazla bozulma nedeni olduğu ortaya çıkmaktadır (Ayhan, 2000).

2.2.5 Antimikrobiyal bileşikler

Gıda maddelerinde mikroorganizmalara karşı direnç, gıdada doğal olarak bulunan ve antimikrobiyal aktivite gösteren bazı bileşikler ile sağlanmaktadır. Bunlar arasında karanfildeki eugenol, sarımsak ve soğandaki allisin, tarçındaki sinnamik aldehit ve eugenol, hardaldaki allil izotiyosiyanat, adaçayındaki eugenol ve timol bulunmaktadır (Ayhan, 2000). İnek sütü; laktoferrin, laktoperoksidaz, lizozim, kazein içerirken; yumurtada lizozim, konalbumin, ovotransferrin, avidin bulunmaktadır. Bu bileşikler, mikroorganizmalara karşı savunmada çok önemlidir (Pazlarova, n.d.). Gram (+) bakteriler, özellikle lizozime duyarlıdır. Antibakteriyel bazı bileşiklerin aynı zamanda antifungal özellik de gösterebilmektedir. Limon ve portakaldaki uçucu yağların belirli konsantrasyonlarda bakterilerin ve *A.parasiticus*'un gelişimini ve bu küfün toksin oluşturmalarını engellediği belirlenmiştir (Ayhan, 2000).

2.2.6 Osmotik basınç

Osmotik basınç, çözeltinin içinde çözünen maddelerin konsantrasyonu ile ilişkilidir. Mikroorganizmalar, içinde gelişme gösterdikleri sıvı besiyerinin osmotik basıncı ile kendi hücre içindeki osmotik basıncı arasında bir denge halindedir. Mikroorganizmanın en iyi gelişme gösterdiği ortamın osmotik basıncı, hücre içindeki osmotik basınç ile aynı veya çok az farklıdır (izotonik çözelti). Bu ortamlarda hücre zarından madde giriş ve çıkışı kolaylıkla olur. Eğer ortamın osmotik basıncı düşük ise (hipotonik çözelti), hücre içine sıvı girişi olur ve hücre şişer. Bu durumun devam etmesi sonucu hücre patlar. Buna plazmoptiz denir. Ortamın osmotik basıncı yüksek ise (hipertonik çözelti) bu durumda hücre içinden ortama su çıkarak hücre zarının hücre duvarından ayrılması ve büzülmesi söz konusu olur. Bu olay ise plazmoliz olarak adlandırılır. Osmoz ise; yarı geçirgen bir membranla ayrılan konsantrasyonları farklı olan iki sıvının bu zardan birbirine doğru geçişini ifade eder. Bu geçiş olayı, her iki ortamın osmotik basıncı veya yoğunluğu birbirine eşit oluncaya kadar devam eder. Mikroorganizmaların osmotik basınçları türe göre farklılık göstermekte olup; hücre içindeki osmotik basınç, protein, aminoasit, karbonhidrat, inorganik tuzlar tarafından oluşturulur. Halofilik ve sakkarofilik mikroorganizmalar haricindeki mikroorganizmalar yüksek tuz ve şeker konsantrasyonlarında gelişemezler. Ancak hipertonik ortamlarda az da olsa gelişme gösterebilen küfler, mayalar, bakteriler ve algler vardır (Arda, 2000).

2.2.7 Sıcaklık–süre

Sıcaklık, mikroorganizma gelişmesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Ancak sıcaklık tek başına yeterli bir kavram olmayıp süre ile birlikte değerlendirildiğinde anlam kazanmaktadır (Arda, 2000). Örneğin; pastörizasyon prosesinin uygulanması sırasında hedef mikroorganizmanın inhibe edilebilmesi için gerekli sıcaklığın yeterli sürede uygulanması gerekmektedir. Yetersiz sürede gerekli sıcaklığa ulaşılmış olması prosesin etkin olmasına yetmemektedir.

Mikroorganizmalar, kendi türlerine özel sıcaklık limitleri içinde (minimum gelişme sıcaklığı ve maksimum gelişme sıcaklığı) gelişme gösterirler. Minimum ve maksimum sıcaklık limitleri arasında mikroorganizmanın en iyi gelişme gösterdiği sıcaklık değeri/sıcaklık aralığı, optimum gelişme sıcaklığı olarak ifade edilmektedir. Optimum sıcaklıktan minimum ve maksimum sıcaklık değerlerine doğru gidildikçe gelişme hızının yavaşladığı ve bu limitlerin dışında mikroorganizma gelişmesinin durduğu görülmektedir. Maksimum limit aşıldığında, gelişme sadece durmakla kalmaz, sıcaklığın yüksekliğine göre, mikroorganizmaların ölümü de meydana gelir. Minimum limitin altına inildiğinde ise, genellikle gelişmede duraklama olup, nadiren sıcaklık derecesi ve sıcaklık düşüş hızına bağlı hücre ölümü meydana gelir (Arda, 2000). Gıda maddeleri üzerinde gelişme gösteren mikroorganizmaların gelişebildikleri sıcaklık değerlerinin bilinmesi, gıdaların depolanması sırasında seçilecek depo sıcaklıkları hakkında bilgi verir. Bir mikroorganizmanın gelişebildiği en düşük sıcaklık -34°C ; en yüksek sıcaklık ise 100°C 'dir. Gelişme sıcaklıklarına göre mikroorganizmalar; psikrofilik mikroorganizmalar, mezofilik mikroorganizmalar ve termofilik mikroorganizmalar olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Psikrotroflar 7°C ve altında gelişebilen ve optimum gelişme sıcaklıkları $20-30^{\circ}\text{C}$ arasında olan mikroorganizmalardır. $20-45^{\circ}\text{C}$ arasında gelişme gösteren ve optimum gelişme sıcaklığı aralığı $30-40^{\circ}\text{C}$ olan mikroorganizmalar mezofilik mikroorganizmalar olarak adlandırılır. 45°C ve daha yüksek sıcaklıkta gelişebilen ve optimum gelişme sıcaklığı aralığı $55-65^{\circ}\text{C}$ arasında olan mikroorganizmalar termofilik mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadır. Çizelge 2.6'da mikroorganizmaların gelişmelerinde sıcaklık gereksinimlerine göre minimum, optimum ve maksimum sıcaklık değerleri gösterilmiştir (Ayhan, 2000).

Çizelge 2.6 : Sıcaklık gereksinimlerine göre mikroorganizmalar ve gelişme sıcaklıkları.

Mikroorganizmalar	Sıcaklık (°C)		
	Minimum	Optimum	Maksimum
Psikrofilik (zorunlu)	(-15)–5	15–20	20–30
Psikrotrofik (fakültatif)	(-5)–7	25–30	30–40
Mezofilik	5–25	30–40	40–50
Termofilik	35–45	45–65	60–90
Zorunlu	40–45	55–65	70–90
Fakültatif	35–40	45–55	60–80

Psikrotrof terimi, daha önceden kullanılan psikrofilik mikroorganizma teriminin yerini almıştır. Psikrofilik mikroorganizma zorunlu ve fakültatif psikrofiller olarak tanımlanmakta olup, fakültatif psikrofil mikroorganizmalara psikrotrof denilmektedir. Küfler; pH, osmotik basınç ve besin içeriğinde olduğu gibi bakterilere oranla daha geniş sıcaklık aralığında gelişme gösterirler. *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Thamnidium* gibi pekçok küf, buzdolabı sıcaklığında yumurta, et ve meyvelerin yüzeyinde gelişebilme yeteneğindedir (Ayhan, 2000).

2.2.8 Ortamın gaz bileşimi

Canlıların birçoğu yaşamlarını sürdürebilmeleri için oksijene ihtiyaç duyarlar. Mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürebilmeleri için oksijene bağımlılıkları ise çok değişiklik göstermekte olup; mikroorganizmanın türüne göre değişir. Mikroorganizmalar; gelişebilmeleri için oksijene olan bağımlılıkları açısından 5 temel gruba ayrılarak incelenmektedir. Bu gruplar: obligat aerobik, obligat anaerobik, fakültatif, mikroaerofil ve aerotolerant şeklindedir (Arda, 2000).

Obligat aerobik mikroorganizmalar; canlı kalabilmeleri ve gelişebilmeleri için mutlaka oksijene gereksinim duyarlar. Doğada diğer gruplara göre daha fazla sayıda bulunurlar. Bu mikroorganizmalar oksijen olmadığı durumlarda gelişemezler, çünkü oksijensiz ortamlarda enerji elde edebilecek mekanizmaya sahip değildirler. Dik agar besiyerlerinde geliştirildikleri zaman genellikle deney tüpünün üst kısmında koloni oluştururlar. *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis* gibi bakteriler, küfler aerobik mikroorganizmalara örnek olarak verilebilir (Arda, 2000).

Fakültatif mikroorganizmalar; hem aerobik hem de anaerobik koşullarda gelişme yeteneğindeki mikroorganizmalardır. Bu gruptaki mikroorganizmaların obligat

aerobik mikroorganizmalardan farkı; fakültatif mikroorganizmaların oksijenin olmadığı koşullarda da gelişmelerini devam ettirebilmelidir. Fakültatif mikroorganizmalar oksijenin bulunduğu koşullarda aerobik olarak gelişme gösterirken; oksijen olmayan durumlarda ise, sülfür, karbon, sodyum nitrat vs. maddeleri hidrojen alıcısı olarak kullanabilmektedir. Ancak fakültatif mikroorganizmalar daha fazla enerji sağlayan aerobik koşullarda daha iyi gelişme gösterirler. Fakültatif mikroorganizmalar dik agarın her bölgesinde gelişme gösterebilirler. *Enterobacter*, *Staphylococcus* gibi mikroorganizmalar bu grupta yer almaktadır (Arda, 2000).

Obligat anaerobik mikroorganizmalar; oksijenin bulunmadığı ortamlarda gelişme gösterirler. Oksijenin bu mikroorganizmalar üzerinde zehirleyici özelliği vardır. Bu grupta bulunan mikroorganizmaların sahip olduğu enzimler oksijen tarafından bloke edilmektedir. Ayrıca enzim sistemleri hidrojeni (H^+) oksijene transfer edemez ve bu nedenle nitrat, sülfat, karbonat vb. başka oksijen alıcısı kullanırlar. Bu mikroorganizmalar dik agar besiortamının dip tarafında gelişme gösterirler. *Clostridium*, *Actinomyces* obligat anaerobik mikroorganizmalar arasında örnek verilebilir (Ayhan, 2000).

Mikroaerofilik mikroorganizmalar; havada bulunan %21 oranındaki oksijen kadar oksijen içeren ortamlarda gelişemezler. Oksijen oranı %1–2 oranında daha az olan veya ortam havasına %5–10 oranında CO_2 katılmış yerlerde gelişme gösterebilirler. Bu mikroorganizmalar anaerobik değildir ve anaerobik koşullarda gelişemezler. *Campylobacter fetus*, *Brucella abortus* gibi mikroorganizmalar mikroaerofilik özellik gösterirler (Arda, 2000). Dik agar besiortamının üst yüzeyine yakın yerlerde gelişme gösterirler.

Aerotolerant mikroorganizmalar ise; daha fazla yüzeyde olmak üzere, hem aerobik hem de anaerobik koşullarda gelişme gösterebilmektedir (Arda, 2000).

2.2.9 Bağıl nem

Bağıl nem; havanın içindeki mevcut su buharının (mutlak nem), aynı sıcaklık ve basınç koşullarında havanın tutabileceği maksimum su buharına (maksimum nem) oranıdır.

Bağıl nem ve su aktivitesi terimleri birbirleriyle yakından ilişkilidir. Kapalı ve denge halindeki bir sistemde; %Denge Bağıl Nemi= $a_w \cdot 100$ eşitliği geçerlidir. Gıda

maddesinin ve ortam havasının dengede olmadığı koşullarda ise geçişler söz konusu olmaktadır. Örneğin düşük su aktiviteli bir gıda maddesinin yüksek bağıl nemde bir ortama bırakılması sonucu; havadan gıda maddesine su geçişi olup, gıda maddesinin nemi artacaktır (Pazlarova, n.d.).

2.3 Mikroorganizmaların Gelişme Evreleri

Bu bölümde mikroorganizmaların gelişme evreleri hakkında bilgi verilecektir.

Mikroorganizmaların hücre sayısında ve kütlesinde meydana gelen artış “gelişme” olarak tanımlanır. Gelişme denildiğinde hücrenin boyutlarının artmasından daha çok, hücre sayısının artışı anlaşılmaktadır. Mikroorganizmaların gelişme evreleri; lag (uyum) fazı, logaritmik (eksponansiyel) artış fazı, sabit faz ve logaritmik azalma/ölüm fazı olmak üzere 4 fazdan oluşmaktadır.

2.3.1 Lag (uyum) fazı

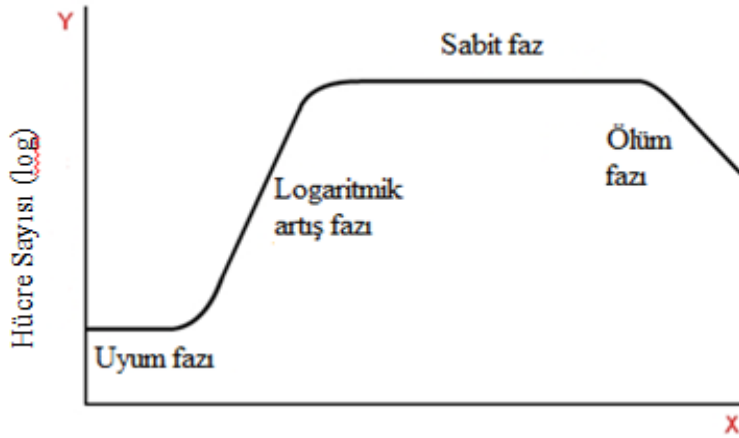
Bir mikroorganizma yeni bir ortama girdiğinde, onun yeni ortama uyum sağlaması belirli bir süre almaktadır. Mikroorganizma çoğalmaya başlamadan önce ortama uyum sağlamalıdır. Bu faz “lag phase (uyum fazı)” olarak adlandırılır. Bu aşama mikroorganizma gelişmesinin başlangıç aşaması olup, hücre sayısında hiçbir artış gözlenmez veya bu artış çok azdır. Hücre metabolizması çok yüksektir. Hücrelerin boyutları artmasına rağmen, hücrelerin sayısal artışı söz konusu değildir. Bu nedenle kütleli artış olmaz. Lag fazının uzunluğu doğrudan mikroorganizmanın önceki gelişme koşullarına bağlıdır. Besin ögeleri açısından zengin bir ortamda geliştirilen bir mikroorganizma, daha zayıf bir ortama inokule edildiğinde, mikroorganizmanın yeni bir çevreye adaptasyonu daha uzun süre almaktadır. Mikroorganizma gelişmesi için gerekli proteinler, ko-enzimler ve vitaminler sentezlenir ve bu durum lag fazını uzatmaktadır. Besin ögeleri açısından zayıf bir ortamda geliştirilen bir mikroorganizma, besin ögeleri açısından zengin bir ortama eklendiğinde, hücre bölünmesi herhangi bir gecikme olmadan başlar ve böylece lag fazı daha kısa olur (Amrita, 2016).

2.3.2 Eksponansiyel/logaritmik artış fazı

Logaritmik gelişme fazı veya eksponansiyel artış fazı olarak adlandırılan mikrobiyal gelişmenin ikinci evresinde, mikroorganizmalarda hızla çoğalma ve hücre sayılarında artış meydana gelir. Metabolik aktiviteleri yükselir ve mikroorganizmaların

hücrelerinde sabit oranda deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonu ile hücre bölünmesi meydana gelir. Besi ortamı maksimum oranda kullanılır ve kültürlerin gelişme hızları maksimum seviyeye ulaşır. Hücre sayısı logaritmik (eksponansiyel) olarak yükselir. Tek hücre ikiye bölündükten sonra 4,8,16,32,64,... ($2^0, 2^1, 2^2, 2^3, 2^4, \dots, 2^n$, n generasyon sayısı) şeklinde bölünmeye devam eder. Hücre bölünmesi, gelişmenin dengeye ulaşmasıyla sonuçlanır. Mikroorganizma hücrelerinin sayısının 2 katına çıkabilmesi için gerekli süre generasyon süresi olarak adlandırılmaktadır. Generasyon süresi, mikroorganizmalara göre farklılık göstermektedir. Örneğin, *Escherichia coli* her 20 dakikada bir bölünür. *Staphylococcus aureus* için generasyon süresi 30 dakikadır (Amrita, 2016).

Mikroorganizmaların gelişme fazlarına ait grafik Şekil 2.2’de gösterilmiştir (Amrita, 2016).



Şekil 2.2 : Mikroorganizma gelişmesine ait fazlar.

2.3.3 Sabit faz

Mikroorganizma popülasyonu gelişmeye devam ederken; gelişme ortamındaki tüm besin ögeleri mikroorganizma gelişmesi için kullanılmaktadır. Bu durum; ortamda atık maddeler, toksik metabolitler ve antibiyotik gibi inhibitör bileşiklerin birikmesine neden olmaktadır. Ortamın pH ve sıcaklık gibi mikroorganizma gelişmesini etkileyen önemli parametreleri, mikroorganizmanın gelişimi açısından istenmeyen değerlere ulaşır. Bu da mikroorganizma gelişmesini olumsuz etkiler. Bölünen hücre sayısı ile ölen hücre sayısı birbirine eşit olur, sonuçta mikroorganizma hücre bölünmesi tamamıyla durur. Hücre sayısı artmaz ve gelişme hızı sabit olur. Sabit fazdaki bir mikroorganizma hücresi alınıp, yeni bir ortama inokule edilirse, bu

hücre kolaylıkla logaritmik gelişme evresine geçerek normal metabolik aktivitesine devam edebilir (Amrita, 2016).

2.3.4 Logaritmik azalma/ölüm fazı

Ortamdaki besin öğelerinin tüketilmesi ve buna bağlı olarak metabolik atıklar ve diğer toksik metabolitlerin artması, mikroorganizmaları ölüm fazına taşır. Bu aşamada, mikroorganizma çoğalma yeteneğini tamamıyla kaybeder. Olumsuz koşullar nedeniyle mikroorganizma hücreleri ölmeye başlar. Mikroorganizma ölümü hızlı ve belirli–düzenli oranda gerçekleşir. Ölen hücre sayısı bu evrede, canlı hücre sayısından fazladır. Bazı mikroorganizmalar spor oluşturarak olumsuz ortam koşullarına direnç gösterebilirler (Amrita, 2016).

2.4 *Aspergillus niger* ve *A.carbonarius* Hakkında Genel Bilgiler

Aspergillus, *Ascomycota* şubesinin bir üyesidir. *Aspergillus* cinsine ait 185’in üzerinde tür bulunmaktadır. Bu türlerden yaklaşık 20 tanesi insan ve hayvan sağlığı açısından zararlı etkilere sahiptir. Bu cinsten aflatoksin üreten *A.flavus* en tanınmış olan türdür. Üzüm ve kahvede, *A.carbonarius* ve *A.ochraceus* OTA oluşturan küf türleridir. *A.niger* ise diğer türlere göre daha az tehlikelidir (Kenyon College, 2010a).

Aspergillus section *Nigri* üyelerinden *A.niger*, *A.carbonarius*, *A.lacticoffeatus*, *A.schlerotioniger*, *A.awamori*, *A.foetidus* ve *A.japonicus* türlerinin OTA üretiminden sorumlu türler olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Samson ve diğ, 2004; Magnoli ve diğ, 2003; 2004; 2006a; 2006b; Battilani ve diğ, 2003). Yapılan bir başka çalışmada *A.foetidus* ve *A.japonicus* türlerinin OTA üretmedikleri bildirilmiştir (Samson ve diğ, 2004). *A.carbonarius* ve *A.niger* OTA üretiminden sorumlu başlıca küfler olarak değerlendirilmekle beraber, *A.niger agg.* tarafından OTA üretim oranı, *A.carbonarius* suşlarına göre daha düşük miktardadır (Battilani ve diğ, 2006; Astoreca ve diğ, 2007).

Aspergillus carbonarius, *Aspergillus* section *Nigri* üyeleri içinde en önemli OTA üreticisi küf türüdür (Belli ve diğ, 2005; Battilani ve diğ, 2008; Nielsen ve diğ, 2009). *A.carbonarius*; üzüm, kuru üzüm ve şarapta OTA kontaminasyonundan sorumlu başlıca küf türüdür (Frisvad ve diğ, 2006). *A.carbonarius* izolatlarının minimum 10°C’de, optimum 20–33°C’de ve maksimum 44°C’de gelişme gösterdiği bulunmuştur. *A.carbonarius*, *A.niger*’e çok benzer yapıda olup; *A.carbonarius*,

A.niger'e oranla daha büyük sporlar oluşturması açısından farklılaşır. Buna ek olarak minör düzeyinde morfolojik farklılıklar bulunmaktadır (JGI, 2016).

Aspergillus niger, gıda maddelerinde sıklıkla karşılaşılan bir küf türüdür. Ancak her suşu OTA üretme yeteneğinde değildir. Sadece birkaç suşu okratoksijenik özellik gösterir. *A.niger*; üzüm, şarap ve kahve çekirdeklerinde *A.carbonarius*'tan sonra ikinci önemli OTA üreticisi küf türüdür (Frisvad ve diğ, 2006). *A.niger* haploid kromozomlu filamentli küf türü olup; hücre dışına enzim ve sitrik asit salgılayabilir. *A.niger* sitrik asit haricinde amilaz, lipaz, proteaz gibi endüstriyel enzimler üretebilmektedir. Bunun haricinde *A.niger* toksik metabolitler de üretmektedir. *A.niger* kolonileri, siyah renkli küf sporları ile kaplanmış şekildedir (Kenyon College, 2010b).

OTA üretiminde; küfün fizyolojik özellikleri, sıcaklık, su aktivitesi (a_w) ve ortam özellikleri gibi pekçok faktör etkili olmaktadır. Serin ve ılıman bölgelerde *Penicillium verrucosum*, *P.nordicum* gibi türler başlıca OTA üreticisi küfler iken; tropikal ve yarı tropikal iklimlerde ise; *A.ochraceus*, *A.carbonarius*, *A.niger* var *niger*, *A.allutaceus* gibi türler başlıca OTA üreticileridir. ılıman bölgelerde *A.niger* var *niger*, *A.carbonarius* küflerinin üzüm, kuru üzüm, kahvede OTA üretminden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Ringot ve diğ, 2006).

Arjantin'deki kurutulmuş üzümelerde yapılan bir çalışmada, örneklerin çoğunda fungal kontaminasyon olduğu belirlenmiştir. Yüzeydeki canlı küfler uzaklaştırılmış olsa da iç kısımlarda meydana gelen küflerin invazyonu bu durumu ortaya çıkarmıştır. Örneklerden izole edilen baskın türler *Aspergillus* (%50.2), *Eurotium* (%21.4) ve *Penicillium* (%13.5) cinslerine aittir. *A.niger* suşunun en yaygın tür olduğu (%37.3), *A.carbonarius* ve *A.japonicus* türlerinin ise daha az bulunduğu (%7.3 ve %2.9) belirtilmiştir. Bu türlerin OTA oluşturma özellikleri incelendiğinde ise, *A.carbonarius* suşunun OTA oluşturmada *A.niger* suşuna göre baskın olduğu ve *A.carbonarius* suşlarının, *A.niger* suşlarından daha güçlü OTA üreticisi oldukları bulunmuştur (Romero ve diğ, 2005).

Avrupa'da yapılan bir çalışmada; yapılan araştırmalarda Avrupa'da üzüm, şarap ve kuru üzümlerdeki OTA kontaminasyonundan başlıca sorumlu küf türünün *A.carbonarius* olduğu, OTA'nın kuru üzümde, şaraba oranla daha yüksek

konsantrasyonlarda bulunduğu (maksimum konsantrasyon değeri: 53 µg/kg) belirtilmiştir (Battilani ve diğ, 2006).

Yunanistan'da yapılan bir çalışmada, kuru üzümelerde gelişen *A.niger* ve *A.carbonarius* suşlarında inceleme yapılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, *A.niger* izolatlarının OTA üretiminde, *A.carbonarius* izolatlarına oranla zayıf olduğu, *A.carbonarius*'un güçlü OTA üreticisi olduğu belirtilmiştir. *A.niger* izolatlarının %79.86'sının ya OTA üretmediği ya da 5.9 ppb'nin altında OTA ürettikleri, sadece %6.29'unun yüksek konsantrasyon oranda (>25 ppb) OTA ürettikleri; *A.carbonarius* izolatlarının %78.35'inin yüksek oranda (>25 ppb) OTA ürettikleri belirtilmiştir (Tjamos ve diğ, 2004).

Kuru üzümelerde yapılan bir çalışmada, gelişme için gerekli optimum sıcaklık değerlerinin (*A.carbonarius* için 30°C ve *A.niger* için 35°C), toksin üretimi için gerekli optimum sıcaklık (her iki tür için de 15–20°C) değerinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Hocking ve diğ, 2007).

Aspergillus carbonarius küfünün OTA üretimi üzerine sıcaklık ve su aktivitesi etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; inkubasyon sıcaklığının 30°C olduğu durumda tüm suşların $a_w=0.82-0.99$ aralığında gelişme gösterdikleri; inkubasyon sıcaklığının 15°C olduğu durumda tüm suşların $a_w=0.94-0.99$ aralığında gelişme gösterdikleri belirtilmiştir. 15°C sıcaklıkta ve $a_w=0.94-0.99$ aralığındaki inkubasyon sonucu 4 tane *A.carbonarius* suşunun ürettiği OTA miktarının, 30°C'deki miktardan daha fazla olduğu; OTA üretiminin suşa bağlı olarak $a_w=0.86$, 0.90 ve 0.94 değerlerinde gerçekleşebildiği ve *A.carbonarius* küfünün düşük ve yüksek sıcaklıklarda geniş su aktivitesi aralığında gelişme gösterebildiği ve OTA üretebildiği belirtilmiştir (Esteban ve diğ, 2006).

İspanya'da yapılan bir çalışmada bulunan sonuçlar şu şekildedir: İspanya'da yetiştirilmiş üzümlerden izole edilen test suşlarından, 120 tane *A.carbonarius* suşundan 89 tanesinin okratoksijenik olduğu ve üretilen OTA miktarının 1.2–3530 ng/mL aralığında değiştiği; 64 tane *A.niger* test suşunun hiçbirinde OTA tespit edilmediği bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; İspanya'da yetiştirilen 5 farklı üzüm çeşidi kullanılarak elde edilen şaraptaki OTA varlığından başlıca *A.carbonarius* türü ve daha az miktarda *A.niger aggregate*'ten özellikle daha

önceden OTA üreticisi olarak tanımlanmamış olan *A.tubingensis* türü sorumlu olarak bildirilmiştir (Medina ve diğ, 2005).

OTA üreten ilk küf türü *A.ochraceus* olarak Van der Merwe ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (Van der Merwe ve diğ, 1965).

Sultani üzümlerinde OTA varlığı ile ilgili yapılan bir çalışmada, 1998 ve 2004 yılları arasında üretilen toplam 264 tane sultani örneği kullanılmıştır. Bu örneklerin; 96 tanesi bağlardan, 168 tanesi de ihracata sevk edilen ürünlerden alınmıştır. Bu örneklerin %32.2'sinin OTA konsantrasyonunun tespit limitinin altında olduğu; %9.8'inin ise 10 ppb limitinin üzerinde olduğu; kalan %58'lik kısmın OTA konsantrasyonunun büyük 0.026–10 µg/kg aralığında olduğu ve yıllara göre konsantrasyonlarda büyük farklılıklar olduğu belirtilmiştir (Meyvacı ve diğ, 2005).

Brezilya üzümlerinden izole edilen *A.carbonarius* ve *A.niger* suşlarının gelişimleri ve OTA oluşturma potansiyelleri üzerine yapılan bir çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir: *A.carbonarius* gelişimi üzerine sıcaklık ve a_w ile pH ve a_w etkileşiminin önemli olduğu; sıcaklığın *A.carbonarius* gelişiminde en etkili parametre olduğu belirtilmiştir. Sıcaklık tek başına antagonistik bir etkiye sahiptir. Sıcaklık yükseldikçe, daha az gelişme gözlemlenmiştir. a_w ise sinerjistik etkiye sahiptir: a_w değeri yükseldikçe daha fazla küf gelişimi gözlenmiştir. pH seviyesinin *A.carbonarius* gelişiminde önemli etkisi olmamasına rağmen a_w ile sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur. *A.carbonarius* 20–33°C sıcaklık aralığında, $a_w=0.95–0.98$ aralığında ve pH=5–6.5 aralığında en yüksek gelişmesini göstermiştir. 10°C'nin altında ve 44°C'nin üzerinde herhangi bir gelişme olmamıştır. *A.niger* suşunun gelişiminde; sıcaklık, a_w ve pH parametrelerinin ve bu parametrelerin birbirleriyle etkileşimlerinin önemli olduğu ve *A.niger* gelişiminde a_w 'nin en etkili parametre olduğu a_w 'den sonraki en etkili parametrenin de sıcaklık olduğu; her iki faktöründe sinerjistik etkisi olduğu (daha yüksek a_w ve sıcaklıkta, daha çok *A.niger* gelişmesi) belirtilmiştir. *A.niger* gelişiminin 24–37°C sıcaklık aralığında, $a_w>0.95$ ve pH=4–6.5 aralığında optimum olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmaya ait OTA üretimi sonuçları ise şu şekildedir: *A.carbonarius* suşu için çalışmadaki tüm parametreler ve birbirleriyle etkileşimleri OTA üretimi açısından önemli olup; a_w , sıcaklık ve pH sırasıyla OTA üretiminde etkili parametrelerdir. a_w ve pH sinerjistik etkiye sahipken, sıcaklık antagonistik etkiye sahiptir. *A.carbonarius*; sıcaklık 15°C, pH>6.0 ve $a_w=0.99$ değerlerinde maksimum konsantrasyonda (8–10 µg/g) OTA üretmiştir.

Sıcaklık 25°C, pH<5.0 ve a_w <0.95 değerlerinde ise 1–3 µg/g aralığında toksin üretmiştir. *A.niger* suşu için çalışmadaki a_w ve sıcaklık parametreleri ve birbirleriyle etkileşimleri OTA üretiminde önemli olup; *A.niger* OTA sentezinde; a_w , sinerjistik; sıcaklık, antagonistik etki göstermektedir. *A.niger* suşunda maksimum OTA üretimi sıcaklık 15°C ve a_w =0.98–0.99 değerlerinde gerçekleşmiş olup; 20–25°C aralığında *A.niger* suşunun OTA üretmediği bildirilmiştir (Passamani ve diğ, 2014).

Avrupa’da yapılan çalışmalarda, şaraptaki OTA konsantrasyonları incelendiğinde; güney bölgelerdeki şaraplarda OTA konsantrasyonunun daha yüksek olduğu ve şarap cinslerinin OTA konsantrasyonlarının sıralamasının ise; kırmızı şarapta en yüksek, rose şarapta orta seviyede ve beyaz şarapta en az olduğu bildirilmiştir (Battilani ve Pietri, 2002).

Üzümde OTA üretimi ile ilgili yapılan bir çalışmada, potansiyel OTA üreticisi 426 suş incelenmiş ve bu suşların %95’inin *A.niger*, %3.5’inin *A.ochraceus* ve %1.1’inin *A.carbonarius*’tan oluştuğu bildirilmiştir. Siyah kuru üzümde *A.niger* suşu fazlasıyla izole edilmiş olmasına rağmen bunların sadece %6’sı OTA üreticisi olarak bildirilmiştir (Iamanaka ve diğ, 2005).

Yapılan bir başka çalışmada; Morocco’daki kuru üzümde OTA seviyesinin 0.05 ± 0.02 (ng/g) ile 4.95 ± 0.02 (ng/g) olduğu ve bu değerlerin Avrupa regülasyonunun maksimum limitinin (10 ng/g) altında olduğu bildirilmiştir (Zinedine ve diğ, 2007).

Kuru üzümde yapılan bir başka çalışmada; sultani ve siyah kuş üzümü olmak üzere 2 çeşit kuru üzüm incelenmiştir. Tüm kuru üzümde bulunan ortalama OTA konsantrasyonu 2.6 µg/kg olarak belirtilmiştir. 27 sultana örneğindeki OTA seviyesinin 54 siyah kuş üzümü örneğindeki OTA seviyesinden daha düşük olduğu belirtilmiştir (Stefanaki ve diğ, 2003).

Kuru üzümde yapılan bir başka çalışmada ise şu sonuçlar bulunmuştur: sultaniler ve kuru üzümde OTA miktarlarının sırasıyla 1.79–8.92 (µg/kg) ve 0.48–7.35 (µg/kg) aralığında değiştiği bildirilmiştir (Çağlarırnak, 2006).

Üzümde izole edilen *Aspergillus* section *Nigri* suşlarının OTA üretimlerine inkubasyon süresinin etkisinin incelendiği bir çalışmada, OTA üretimi açısından; *A.carbonarius* suşlarının *A.niger* suşlarından daha güçlü üretici oldukları, *A.carbonarius* ve *A.niger* suşlarında maksimum OTA üretiminin 5 günlük

inkubasyon periyodunda olduğu ve ilerleyen günlerde tespit edilen miktarın giderek azaldığı belirtilmiştir (Belli ve diğ, 2004).

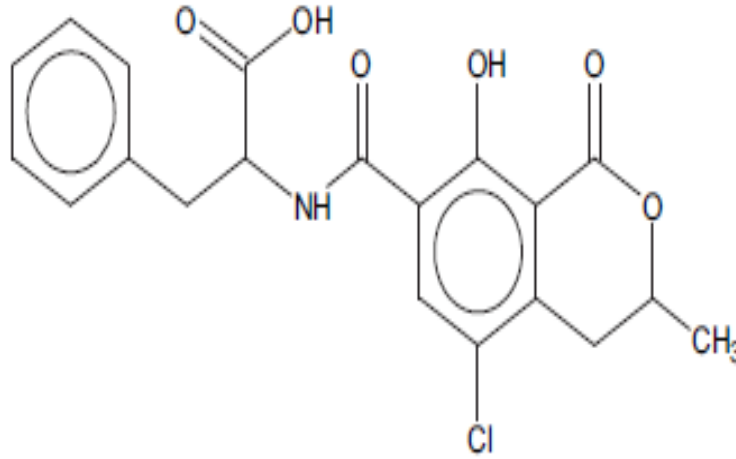
Yapılan bir başka çalışmada, siyah *Aspergillus*'lar arasında Temmuz–Ağustos aylarında güneş ışığında kurutulan üzümlerde *A.niger* suşlarının baskın tür oldukları; bu durumun oluşmasında, *A.niger* küfünün *A.carbonarius* küfüne oranla yüksek sıcaklıklarda gelişmeye daha hızlı uyum sağlamasının ve daha geniş a_w ve sıcaklık değerlerinde gelişebilmesinin etkili olduğu belirtilmiştir (Valero ve diğ, 2005).

2.5 Okratoksin A (OTA) Hakkında Genel Bilgiler

Bu bölümde; OTA'nın kimyasal yapısı, OTA üreten küf türleri, OTA açısından riskli gıdalar, OTA'nın insan sağlığı üzerine etkileri ve OTA için belirlenen limit değerler hakkında bilgi verilecektir.

2.5.1 OTA'nın kimyasal yapısı

Okratoksinler, küflerin sekonder metabolitleri olan mikotoksinlerin bir grubu olup; okratoksin A (OTA), okratoksin B (deklorür OTA), okratoksin C (etillendirilmiş OTA) olmak üzere farklı fraksiyonlara ayrılmaktadır (Reddy ve Bhoola, 2010). Bu fraksiyonlar arasında; en toksik olan ve en sık karşılaşılan OTA fraksiyonudur (Hussein ve Brasel, 2001; Richard, 2007). OTA'nın kimyasal adlandırması şu şekildedir: R-N-[(5-kloro-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-metil-1-okso-1H-2-benzopiran-7-il) karbonil]-fenilalanin (Berente ve diğ, 2005). Okratoksinler, L-β-fenilalanin yapısına bağlı izokumarin türevleridir (Golan, 2008b). OTA'nın yapısında Cl bulunması onu diğer fraksiyonlardan ayıran bir özelliktir (Murphy ve diğ, 2006). OTA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.3'te gösterilmiştir (Duarte ve diğ, 2010). OTA; UV ışığı altında floresans veren, renksiz, kristal yapıda bir bileşiktir. Ampirik formülü $C_{20}H_{18}O_6NCl$ şeklinde olup; molekül ağırlığı $MW=403.82$ 'dir. Organik çözücülerdeki çözünürlüğü yüksek; sudaki çözünürlüğü ise daha düşüktür (Ringot ve diğ, 2006). Sodyum hidrojen karbonatın sulu çözeltisinde de çözünmektedir. OTA'nın erime noktası, benzenden rekristalize edildiğinde $90^{\circ}C$ ve ksilenden rekristalize edildiğinde $171^{\circ}C$ 'dir (Duarte ve diğ, 2010).



Şekil 2.3 : OTA'nın kimyasal yapısı.

Mikotoksinlerin analizinde çeşitli metotlar/teknikler kullanılmaktadır. İnce tabaka kromatografisi (thin layer chromatography–TLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography–HPLC), gaz kromatografisi (gas chromatography–GC), kapiler elektroforez (capillary electrophoresis–CE) ve enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA) metotlarından birisi kullanılarak mikotoksinler analizlenmektedir (Turner ve diğ, 2009).

2.5.2 OTA üreten küf türleri

OTA üreten küf türlerine hem *Penicillium* cinsinde hem de *Aspergillus* cinsinde rastlanmaktadır. Sekonder küf metabolitlerinden biri olan OTA'yı üreten *Penicillium* cinsine ait türler: *P.verrucosum* ve *P.nordicum* türleridir (Larsen ve diğ, 2001). OTA üreten *Aspergillus* cinsine ait küf türleri şunlardır: *A.ochraceus*, *A.sulphureus*, *A.carbonarius*, *A.niger* ve *A.schlerotiorum* türleridir (Batista ve diğ, 2003; Frisvad ve diğ, 2004; Pitt, 2000; Samson ve diğ, 2004).

2.5.3 OTA açısından riskli gıda maddeleri

Doğal bir kontaminant olan OTA açısından riskli gıdalar: hububatlar, şarap, üzüm, üzüm suyu, kahve ve kahve çekirdekleri, kakao, baharatlar ve kuru üzüm çeşitleridir (Kabak, 2009). OTA, bu ürünlerin türevlerinde de termostabiliteleri nedeniyle bulunabilmektedir. OTA, toksik bir sekonder metabolit olup *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait çeşitli funguslar tarafından üretilebilmektedir. Tahıllardaki OTA, başlıca *P.verrucosum* tarafından üretilirken; üzüm, kahve ve kakaodaki OTA, *A.carbonarius* tarafından üretilir. OTA açısından riskli ürünlerde hasat öncesi

tarlada, hasatta ve depolamada fungal gelişimi etkileyen kritik faktörler: sıcaklık, nem içeriği, ürünün olumsuz koşullara maruz kaldığı süre ve diğer faktörler (spor varlığı, mekanik konum, böcek zararlanması, fırtına ve yağmurun zarar vermesi, pH, O₂-CO₂ seviyesi) şeklindedir (Amezqueta ve diğ, 2009).

Buğday, arpa, yulaf, çavdar, mısır ve pirinç gibi tahıllar yüksek konsantrasyonda OTA içerirler. Yulaf ve arpalarda genellikle, OTA konsantrasyonu daha düşüktür (Tunail, 2000). Üzümde OTA ise, birçok ülkede birçok araştırmacı tarafından araştırılmaktadır. Üzüm, gelişme evresinin erken evrelerinde küf kontaminasyonuna daha yatkındır. Ayrıca böcek zararlanması da küf gelişimine olumlu yönde katkı sağlar. Böceklenmiş üzüm, taze üzüme göre daha kolay enfekte olma özelliğine sahiptir (Golan, 2008a). Çünkü böcekler küfün ürünü daha kolay enfekte etmesini sağlar. Tahıllar, üzüm gibi ılıman bölgelerde yetişen ekinler, değişen çevre koşullarından çok etkilenirler. Burada önemli olan nokta, fungusların ürüne nüfuz etmesini ve OTA oluşumunu engellemek, bitkinin nem değerini ve kuraklık stresini azaltmaktır (Amezqueta ve diğ, 2009).

OTA; kahve, kakao gibi ürünlerde de önemli bir sorundur. Kahve, kakao gibi tropikal bölgelerde yetişen ekinlerde de çevre koşulları küf gelişiminin üzerinde önemli bir parametredir. Yüksek sıcaklık, nemli hava, sağanak yağmur küf gelişimini teşvik eder. Bu gibi ürünler homojen ve olabildiğince hızlı bir şekilde kurutulmalıdır. Kahve ve kakao gibi ürünler, kurutma öncesi fermentasyon prosesinden geçerler. Fermentasyon prosesi genel bir kural olarak, küflerin azalmasına neden olurken; küflerin önemli bir substratı olan küspe kısmının ayrılmasını da sağlar. Kabuk soyma prosesinde de tüm koşullar çok iyi kontrol edilmelidir. Çünkü kahve, kakao gibi ürünlerin kabukları OTA kontaminasyonu açısından son derece uygundur (Amezqueta ve diğ, 2009). Tüm bu ürün grupları açısından değerlendirildiğinde, ürün üretildikten sonra depolanma süreci de çok önemlidir. Kurutulmuş/kurutma prosesi görmüş ürünlerin tekrar nem almamasına, sıcaklık, pH vb. parametrelerin kontrol edilmesine dikkat edilmelidir.

2.5.4 OTA'nın sağlık üzerine etkileri

Mikotoksinlerin tüketimi sonucu insan ve hayvan gibi yüksek yapılı canlılarda görülen toksik sendromlara “mikotoksikozis” adı verilir. Mikotoksinlerin insanlara geçişi; “birincil mikotoksikozis” ve “ikincil mikotoksikozis” olmak üzere iki yolla

olabilmektedir. Doğrudan mikotoksin içeren gıdaların tüketimi sonucu insan ve hayvanlarda oluşan mikotoksikozise birincil mikotoksikozis adı verilir. Hayvanlar tarafından mikotoksinlerle bulaşan yemlerin tüketimi sonucu mikotoksinlerin et, süt ve yumurta gibi hayvansal ürünlere geçebilir. Bu ürünlerin tüketilmesi sonucu ortaya çıkan mikotoksikozis ise ikincil mikotoksikozis olarak tanımlanmaktadır (Erginkaya ve Kabak, 2011).

Okratoksin A (OTA); hem insan popülasyonlarında hem de canlı hayvan gruplarında karşılaşılan böbrek problemleriyle bağlantılı nefrotoksik (böbrekte etkili toksisite) bir mikotoksindir. Nefrotoksik etkisinin yanısıra kanserojen (kanser oluşturma etkisi), genotoksik (genler üzerinde etkili toksisite), immunosupresif (bağışıklık sistemini baskılayıp zayıflatan), teratojenik (embriyonal gelişimi etkileyen toksisite), mutajenik (DNA'nın yapısında mutasyon meydana gelmesi), hepatotoksik (karaciğerde etkili toksisite) etkilere de sahiptir (Cabanas ve diğ., 2008; Zhang ve diğ., 2011). Bu nedenle OTA; Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization–WHO) kurumuna bağlı olarak çalışmalarını yürüten, Uluslararası Kanser Araştırmaları Dairesi (International Agency Research on Cancer–IARC) tarafından “potansiyel kanserojen madde” olarak Grup 2B’de sınıflandırılmıştır (Zhang ve diğ., 2011). OTA başlıca böbrek toksinidir. Ancak, yeterli oranda yüksek konsantrasyonlarda karaciğere de zararlı etkileri olmaktadır (Richard, 2007). OTA’nın toksisite mekanizması; lakton kısmının substrata bağlanmasıyla açıklanmaktadır. OTA’nın lakton kısmı yapısal olarak mitokondri enzimlerinin aktif kısımlarının analogu olup substrata bağlanır ve asıl mitokondriyal enzimlerle rekabet eder. OTA’nın etki mekanizması için yapılan çalışmalarda; OTA’nın, kobayların karaciğer mitokondrilerindeki ATPase, süksinat dehidrogenaz ve sitokrom C oksidaz enzimlerini inhibe ettiği bulunmuştur (Hussein ve Brasel, 2001). OTA’nın hem akut hem de kronik toksik etkileri bulunmaktadır. Akut etki, toksik etken ile karşılaşıldığında vücutta bağışıklık sistemi tarafından hızla geliştirilen ve toksik etkene karşı verilen tepkidir. Akut toksisite ise, toksik etkenin vücutta hızla tepki oluşmasına neden olmasıdır. OTA’nın akut toksisite dozu erkek sıçanlarda $LD_{50}=29$ mg/kg ve dişi sıçanlarda $LD_{50}=22$ mg/kg’dır. OTA’nın teratojenik etkisi özellikle civciv ve farelerde kafa bozuklukları, gaga hataları ve göz gelişiminin engellenmesi şeklinde izlenir (Tunail, 2000). Kronik etki, toksik etken ile karşılaşıldığında vücutta hemen değil, uzun zaman ve birikim sonucu geliştirilen tepkidir. Kronik toksisite ise,

toksik etkenin vücutta birikerek uzun zaman içinde tepki oluşmasıdır. OTA'nın, insanlar üzerindeki etkisine ilişkin somut kanıtlar olmamakla beraber Bulgaristan, Romanya, Yugoslavya ve Tuna Nehri kıyısı kırsal kesiminde görülen ve adını bu bölgeden alan Balkan nefropatisi (Balkan Endemic Nephropathy–BEN) ile ilişkisi konusunda kuvvetli bulgular vardır. BEN görülen bölgelerde yaşayan insanların kan örneklerinde OTA'ya rastlanma sıklığı ve OTA konsantrasyonu oldukça yüksektir. Ayrıca OTA, geniş getiren hayvanlarda ve kümes hayvanlarında da ağır böbrek hastalıklarına neden olmaktadır (Tunail, 2000).

2.5.5 RASFF’de OTA ve kuru üzüm durumu

Avrupa Birliği (European Union–EU), dünyadaki en yüksek gıda güvenliği standartlarından birisine sahiptir. Bu durumu, tüketicilere gıda maddelerinin güvenliğinin sağlanmasını Avrupa Birliği Mevzuatı (EU Legislation) ile gerçekleştirmektedir. Besin zincirinde tüketici sağlığı açısından riskli olan ürünlerin dünya çapında ve hızla belirlenmesi amacıyla bir araç geliştirilmiştir. Bu araç, Gıda ve Yem için Hızlı Alarm Sistemi (Rapid Alert System for Food and Feed - RASFF)’dir (RASFF, 2016). RASFF sisteminde; gıda, yem ve gıda ile temas eden materyaller için tanımlanan riskler, riskin ciddiyetine göre; “alarm bildirimi (alert notification)”, “bilgilendirme bildirimi (information notification)”, “sınırdan reddetme bildirimi (border rejection notification)”, “orijinal bildirim ve takip bildirimi (original notifications and follow-up notification)” ve “reddetme ve geri çekme bildirimi (rejected and withdrawn notification)” şeklinde sınıflandırılmaktadır. Alert notification; bulunan bir gıda maddesinin ciddi riskli olduğunu ve ilgili ülkeyi uyarmaktan önce derhal hızlıca aksiyon alınması gerekliliğini gösterir. Information notification; gıda maddesinin riskinin tanımlanması sonucu gıda maddesinin ciddi bir risk oluşturmadığı veya bildirim sırasında ürünün piyasada olmadığını gösterir. Border rejection notification; gıda, yem maddesinin veya gıda ile temas eden materyalin insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından riskli olması nedeniyle gümrükte reddedilmesi durumunu gösterir. “Original notifications and follow-up notifications”; RASFF’de daha önceden hiç bildirimi olmayan bir gıda maddesi, yem veya gıda ile temas eden materyalin bildirimini gösterir. Bu bildirim daha sonra “alert, information veya border rejection notification” olarak sınıflandırılır. “Rejected and withdrawn notification”; orijinal bildirim RASFF’nin bir üyesine gönderildikten sonra, bu maddenin reddedilebilir veya geri çekilebilir olduğu durumda yapılan bildirimdir

(RASFF, 2015). Son 5 yılda orijinal bildirimlerin sayıları Çizelge 2.7’de gösterilmiştir (RASFF, 2015).

Çizelge 2.7 : Son 5 yıllık RASFF orijinal bildirim sayıları.

Yıl	Alarm	Sınırdan reddetme	Bilgilendirme	Takip
2011	617	1820	720	551
2012	523	1712	679	507
2013	584	1438	679	429
2014	725	1357	605	402
2015	750	1380	476	378
% azalma	+3.4	+1.7	-21.3	-6.0

2015 yılı RASFF yıllık raporuna göre, Türkiye’ye OTA açısından herhangi bir bildirim yapılmamıştır (RASFF, 2015).

2014 yılı RASFF yıllık raporuna göre, Türkiye’ye OTA açısından herhangi bir bildirim yapılmamıştır (RASFF, 2014).

2013 yılı RASFF yıllık raporuna göre; 2004–2013 yılları arasında gıda ve yemlerdeki mikotoksinlere yapılan bildirim sayıları Çizelge 2.8’de gösterilmiştir (RASFF, 2013).

Çizelge 2.8 : Gıda ve yemlerde mikotoksin bildirimleri.

Tehlike	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Aflatoksin	839	946	801	705	902	638	649	585	484	341
Deoxynivalenol (DON)	-	-	-	10	4	3	2	11	4	8
Fumonisinler	14	2	15	9	2	1	3	4	4	7
Okratoksin A (OTA)	27	42	54	30	20	27	34	35	32	54
Patulin	-	6	7	-	3	-	-	-	-	-
Zearalenone	-	-	1	6	2	-	-	-	4	-
Toplam mikotoksin	880	996	878	760	933	669	688	635	528	410

2013 yılında OTA’da 54 tane bildirim alınmıştır. Bu değer 2012’ye oranla yüksektir. 54 bildirimin 31 tanesi “meyve–sebze” kategorisindeki özellikle kuru incire aittir. Türkiye’den kuru incir için 13 bildirim; kurutulmuş şaraplık üzüm için Türkiye’den 3; Afganistan’dan 5; Özbekistan’dan 4 ve İran’dan 2 bildirim bulunmaktadır (RASFF, 2013).

2.5.6 OTA için limit değerler

OTA'nın, insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle gıda maddelerinde bulunması riskli olup, OTA gıda maddelerinde belirlenmiş olan limit değerlere sahiptir. Bu değerler ulusal ve uluslararası kuruluşlar tarafından belirlenmektedir.

Uluslararası bir kuruluş olan European Commission'a göre; gıdalarda bulunan OTA'nın çocuklar ve bebekler için maksimum limiti; 0,5 µg/kg olarak belirlenmiştir (European Commission, 2010).

Codex Alimentarius standartlarına göre; gıdalarda bulunan OTA için maksimum limit değerler Çizelge 2.9'da gösterilmiştir (Codex Alimentarius, 2013).

Çizelge 2.9 : Gıdalarda OTA için maksimum limit değerler.

Gıda Tipi	Maksimum Limit (µg/kg)
Buğday	5
Çavdar	5
Arpa	5

Ulusal olarak OTA için limit değerler, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde belirtilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde OTA için belirlenen maksimum limitler Çizelge 2.10'da gösterilmiştir (TGK, 2011).

Çizelge 2.10 : TGK'ye göre OTA maksimum limitleri.

Gıda Tipi	OTA için maksimum limit (µg/kg)
İşlenmemiş tahıllar	5,0
İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3,0
Kurutulmuş asma meyveleri (kuş üzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm)	10,0
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,0
Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve	10,0
Şarap ve meyve şarapları (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az %15 olan şaraplar hariç)	2,0
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli	2,0
Üzüm suyu, konsantreden üretilen üzüm suyu, üzüm nektarı, üzüm şırası ve konsantreden üretilen üzüm şırası (doğrudan insan tüketimine sunulan)	2,0
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,5
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,5
Karabiber (<i>Piper spp.</i>) (Bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil)	
Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>)	
Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>)	
Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>)	15,0
Kırmızıbiber (<i>Capsicum spp.</i>) (Bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil)	
Bu satırda belirtilen baharatın bir tanesini içeren karışım baharat	
Meyan kökü (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>G. inflata</i> ve diğer türler)	20,0
Meyan kökü (bitkisel infüzyon bileşeni olarak kullanılanlar)	20,0
Meyan kökü ekstraktı (özellikle alkol-süzü içecek ve şekerleme üretiminde kullanılan)	80,0
Buğday gluteni (Tüketiciye doğrudan satılmayan)	8,0

2.6 Kromatografi ve HPLC Hakkında Genel Bilgiler

Bu bölümde; giriş, kromatografinin ortaya çıkışı, kromatografik tekniklerin sınıflandırılması ve HPLC hakkında genel bilgiler konularından bahsedilecektir.

Kromatografi, kompleks karışımlardaki kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve tayini için sıklıkla kullanılan analitik bir metottur. Başka bir tanımla kromatografi, gaz veya sıvı haldeki bir hareketli fazda bulunan karışımdaki bileşenlerin, durgun fazdan geçiş hızlarına bağlı olarak ayrıldıkları bir teknik şeklinde de tanımlanabilir. Çok değişik sistem ve tekniğe uygulandığı için, kromatografi teriminin tam bir tanımını yapmak zordur. Ancak, bu metotların tümünde ortak olarak bir “durgun faz” ve bir de “hareketli faz” bulunmaktadır. Kromatografide, bir kolon içinde veya düz bir yüzeyde tutturulmuş faza durgun (sabit faz) denir (Skoog ve diğ, 1999). Sabit faz (stationary phase), mobil faz içerisinde gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları faz olarak da tanımlanabilir. Kromatografi metodu için tasarlanmış ve değişik materyallerden çeşitli ebatlarda üretilerek “kolon” olarak adlandırılan sabit fazlar bulunmaktadır (Kılınç, 2010). Kromatografide durgun fazın üzerinden veya arasından geçen ve analiti de içeren faza hareketli (mobil) faz adı verilir (Skoog ve diğ, 1999). Mobil faz (mobile phase); örnek bileşenlerini, kolon (sabit faz) boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözelti veya çözücü karışımlarıdır. Analizde kullanılacak mobil fazın seçiminde, analizi yapılacak örnek madde bileşenlerinin özellikleri, kullanılacak sabit faz, dedektör özellikleri gibi pekçok noktaya dikkat edilmektedir (Kılınç, 2010). Akış halinde gaz veya sıvı bir fazla birlikte karışımdaki bileşenler, durgun (sabit) faz üzerinden geçirilir; bileşenlerin geçiş hızlarına bağlı olarak ayırım gerçekleşir (Skoog ve diğ, 1999). Kromatografide, mobil fazın içinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşim olması nedeniyle bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, bileşenlere göre farklılık gösterdiği için bileşenler sabit fazın sonlarına doğru farklı hızlarda ilerleyerek birbirinden ayrılmış olurlar. Böylece sabit fazdan çıkan bileşenlerin derimimleri uygun bir biçimde ölçülerek zamana veya mobil fazın kullanılan hacmine karşı y-ekseninde belirtilerek “kromatogram” adı verilen grafikler elde edilmektedir (Kılınç, 2010).

Kromatografide alıkonma ve alıkonma süresi olmak üzere iki önemli kavram bulunmaktadır. Mobil faz içinde, analizi yapılacak maddenin bileşenlerinin sabit faz ile etkileşime girerek belirli bir oranda tutulması, bir başka deyişle yavaşlatılması ve sonuç olarak bileşenin sabit fazı daha geç terk etmesi olayına “alıkonma (retention)”;

alıkonma özelliği kullanılarak belirli sabit deneysel koşullar altında, analizi yapılan maddenin sabit fazı terketmesi ve dedektöre ulaşması için geçen süreye ise “alıkonma süresi (retention time- t_r)” denilmektedir. Alıkonma süresi, her kimyasal madde için parmak izi niteliğindedir (Kılınç, 2010).

2.6.1 Kromatografinin ortaya çıkışı

Kromatografinin gelişimi ilk olarak 1800’lü yıllara dayanmaktadır. 1855 yılında Alman kimyacı Friedrich Ferdinand Runge; boyaların tanınmasında reaktif emdirilmiş filtre kağıdı kullanımını önermiştir. 1860 yılında Christian Friedrich Schönbein ve öğrencisi Friedrich Goppelsroeder maddelerin filtre kağıdında çözgenle farklı hızlarda sürüklendiğine dair çalışmalar yapmışlardır (Kılınç, 2010).

Kromatografi, 21. yüzyılın başlarında Rus botanikçi Mikhail Tswett, tarafından bulunmuştur. Tswett, çözeltileri ince boyutta kalsiyum karbonat (CaCO_3) içeren bir kolondan geçirerek klorofil ve ksantofil gibi bitki pigmentlerini ayırmak için kromatografi tekniğini kullanmıştır. Ayrılmış bileşenler kolonda renkli bantlar halinde görülmeleri nedeniyle; Yunanca’da “renk” anlamına gelen “chroma” ve “yazmak” anlamına gelen “graphein” sözcüklerinin birleşiminden oluşan “kromatografi” sözcüğü bu analitik metodun adı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Skoog ve diğ., 1999).

2.6.2 Kromatografik tekniklerin sınıflandırılması

Kromatografik teknikler için; çeşitli kıstaslara göre farklı sınıflandırmalar yapılmaktadır. Kromatografik teknikler; ayrılma mekanizmalarına göre, uygulama biçimine göre, faz tiplerine göre sınıflandırılmaktadır. Ayrılma mekanizmalarına göre kromatografik teknikler; adsorpsiyon kromatografisi, partisyon kromatografisi, iyon değişirme kromatografisi, jel filtrasyon (moleküler eleme) kromatografisi, iyon çifti kromatografisi ve afinite kromatografisi olmak üzere 6’ya ayrılır (Hacettepe, t.y.). Uygulama biçimine göre; düzlemsel kromatografi ve kolon kromatografisi olarak iki başlıkta değerlendirilir. Düzlemsel kromatografide ise, durgun (sabit) faz düz bir yüzeyde veya bir kağıdın gözeneklerinde tutulur. Bu durumda, hareketli

(mobil) faz, durgun (sabit) faz kılcal etki veya yerçekimi etkisiyle hareket eder. İnce tabaka kromatografisi (thin layer chromatography–TLC), kağıt kromatografisi (paper chromatography–PC) ve elektromatografi teknikleri bu sınıfa girer. Kolon kromatografisinde; durgun (sabit) faz dar bir boruda tutulur, hareketli (mobil) faz ise yerçekimi veya basınç etkisiyle borudan geçirilir. Gaz kromatografisi (gas chromatography–GC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography–HPLC) teknikleri bu grupta yer almaktadır (Skoog ve diğ, 1999; Hacettepe, t.y.). Faz tiplerine göre kromatografi ise; sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisi olarak ayrılmaktadır. Sıvı kromatografisi, sıvı–katı kromatografisi ve sıvı–sıvı kromatografisi olarak; gaz kromatografisi, gaz–katı kromatografisi ve gaz–sıvı kromatografisi olarak alt başlıklara ayrılmaktadır (Hacettepe, t.y.).

Bu tez çalışmasında OTA analizi için HPLC tekniği kullanılması nedeniyle, yukarıda belirtilen tekniklerden HPLC tekniği hakkında bilgi verilecektir.

2.6.3 HPLC tekniği hakkında bilgiler

Sıvı kromatografisi düzlemsel yüzeylere ve kolonlara uygulanabilen bir kromatografi türüdür (Hacettepe, t.y.). Durgun (sabit) faz ile hareketli (mobil) fazın polaritelerine bağlı, normal faz sıvı kromatografisi ve ters faz sıvı kromatografisi olmak üzere iki tip kromatografi bulunmaktadır. Sıvı kromatografi ile yapılan ilk çalışmalarda durgun (sabit) faz olarak trietilen glikol ve su gibi polaritesi yüksek maddeler kullanılmıştır. Hareketli (mobil) faz olarak ise hegzan veya i–propil eter gibi polaritesi daha düşük/nispeten apolar çözücüler kullanılmıştır. Böyle özellikteki kromatografi, normal faz kromatografisi olarak adlandırılmaktadır. Ters–faz kromatografide, durgun (sabit) faz apolar bir hidrokarbon; hareketli faz ise polar bir çözücüdür. Normal faz kromatografide polaritesi en az olan bileşen kolondan ilk çıkar ve hareketli fazın polaritesi arttıkça alıkonma süresi azalır. Ters–faz kromatografide ise polaritesi en yüksek olan bileşen kolondan ilk önce çıkar ve hareketli fazın polaritesi yükseldikçe alıkonma süresi artar. HPLC ile yapılan analizlerin çoğunluğu oktil– veya oktildesil siloksan bağlı dolgu maddesi bulunduran ters–faz kromatografisi ile yapılmaktadır (Skoog ve diğ, 1999). Ters–faz kromatografisinin, normal faz kromatografisine göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir (Hacettepe, t.y.):

- ✓ Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli olup, hareketli (mobil) fazdaki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklar oluşturabilir.
- ✓ Ters faz kromatografide dengeye ulaşma normal faz kromatografiye oranla daha hızlı gerçekleşir.
- ✓ Normal faz kromatografide polar maddelerin alıkonması çok yavaştır ve piklerin yayvanlaşmasına neden olur.
- ✓ Apolar çözücüler çok pahalıdır.
- ✓ Apolar çözücülerin nem almamasının sağlanması çok zordur.

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography–HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu mobil fazla etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği arttırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için basınç uygulanması gereklidir. HPLC’de mobil faz, sabit faz içine yüksek basınçla pompalanmaktadır (Hacettepe, t.y.). Bu nedenle bazı kaynaklarda HPLC için “High Pressure Liquid Chromatography” ismi de kullanılmaktadır (Kılınç, 2010).

HPLC tekniğinin kullanımının avantajları aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir (Hacettepe, t.y.):

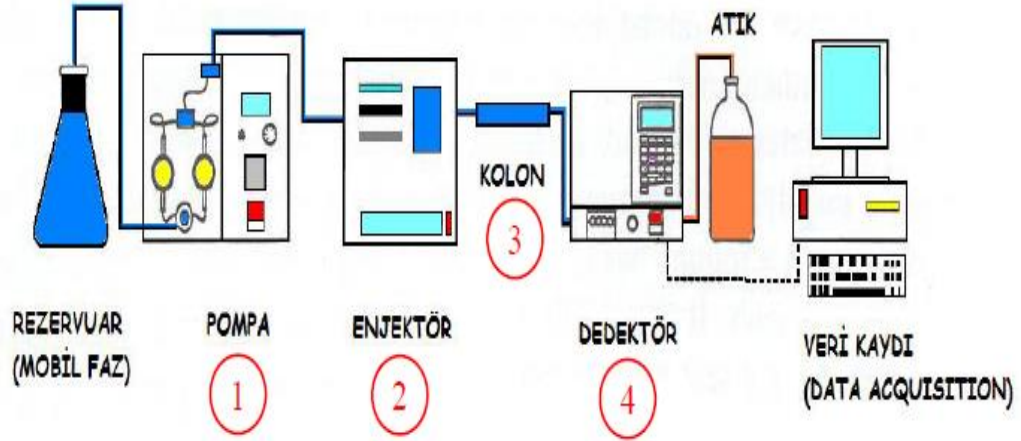
- ✓ HPLC kolonu tek kullanımlık değildir ve birdeğ fazla kez kullanılabilir.
- ✓ HPLC tekniği analistin beceri ve tecrübesine daha az bağımlı olup, tekrarlanabilirlik yüksektir.
- ✓ HPLC ile kantitatif analiz yapmak mümkündür.
- ✓ Analiz süresi kısadır.
- ✓ Yöntemin duyarlılığı yüksektir.

2.6.3.1 HPLC cihazının bileşenleri

Standart bir HPLC cihazının donanımı sırasıyla; pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektör olmak üzere 4 temel bileşenden oluşmaktadır. Güncel analizlerde bu

donanımına ek olarak gaz uzaklaştırıcı (online degasser), kolon fırını (column oven), otomatik örnekleyici (autosampler), fraksiyon toplayıcı (fraction collector) vb. ara üniteler de ilave edilebilmektedir (Kılınç, 2010).

Şekil 2.4'te standart bir HPLC cihazının bileşenleri gösterilmiştir (Kılınç, 2010).



Şekil 2.4 : Standart bir HPLC cihazının bileşenleri.

Pompa

HPLC cihazının ilk bileşeni pompadır. HPLC donanımında yer alan pompalama sistemleri; akış hızına göre, pompanın yapımında kullanılan malzemeye göre ve pompanın mobil fazı iletme mekanizmasına göre olmak üzere 3 farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Akış hızına göre; mikro hacim pompa sistemleri (microbore pumping systems), standart hacim pompa sistemleri (standart bore pumping systems) ve preparatif pompa sistemleri (preparative pumping systems) olarak ayrılır. Mikro hacim pompa sistemleri, iç çapı 2 mm'ye kadar olan kolonlar için kullanılır ve 1–250 μL /dakika aralığında akış hızı sağlarlar. Standart hacim pompa sistemleri; analitik HPLC uygulamalarında en sık kullanılan pompa sistemi olup 100 μL –10 mL/dakika aralığında akış hızı sağlarlar. Yarı preparatif HPLC uygulamalarında iç çapı 12 mm'ye kadar olan kolonlar için tercih edilirler. Preparatif pompa sistemleri analitik HPLC uygulamalarının dışındaki çalışma alanlarında (büyük hacimde saflaştırma ve ayırma) kullanılır ve 10 mL/dakika'dan büyük akış hızı sağlarlar. Pompanın yapıldığı malzemeye göre metalik ve ametalik olarak ayrılır. En çok tercih edilen metalik malzeme, mekanik dayanıklılığı, aşınma direnci ve iyi termal stabilitesi nedeniyle 316 paslanmaz çeliktir. Bir diğer metal alternatifi ise titanyumdur. Mekanik dayanıklılık özellikleri 316 paslanmaz çeliğe benzemekle birlikte, aşınma direnci ve

kimyasallara karşı inertliği daha fazladır. Ametalik pompalar arasında; polietilenketon (PEEK), politetrafloroetilen (TEFLON) ve seramik materyaller tercih edilmektedir. Mobil faz iletme mekanizmasına göre; şırınga tipi pompalar ve pistonlu pompalar olarak 2'ye ayrılır. Şırınga tipi pompalar; çok kullanılmamakla birlikte akış hızının 100 µL/dakika'dan daha az olduğu uygulamalarda (örnek: kapiler sıvı kromatografisi uygulamaları) tercih edilmektedirler. 10–50 mL hacminde bir şırıngaya pistonun elektrik motoruyla ittirilmesiyle akış sağlanmaktadır. Pistonlu pompalar; modern HPLC donanımının standart parçasıdır. Yapısı iki kısım hareketli parçadan oluşur. Bunlar, çözeltinin pompalanırken geri kaçmasını engelleyen vana sistemleri ve pistonlardır (Kılınç, 2010).

Enjektör

HPLC donanımının ikinci bileşeni enjektördür. Enjektör analizlenecek örneğin sabit faz (kolon) öncesinde mobil faza enjekte edilmesi için kullanılır. Sahip olduğu sarmal (loop) sayesinde insan faktöründen kaynaklanan enjeksiyon hacmi hata oranı sıfıra indirilmiştir. Elle kumanda edilen manuel ve bilgisayar kumandalı otomatik enjektörler (otomatik örnekleyici–autosampler) olmak üzere 2 çeşidi bulunmaktadır. Manuel enjektörde; örneğin enjekte edilebilmesi için enjektör önce yükleme (load) pozisyonuna getirilerek örnek, isteğe göre seçilebilen sabit hacimli, loop içerisine doldurulur. Daha sonra enjektörün kolu enjeksiyon (inject) pozisyonuna getirilerek örnek mobil faz içerisine enjekte edilmiş olur. Otomatik enjektörde ise; XY ve carousel olmak üzere iki tip mevcuttur. XY tipinde enjektör hareketli olup belirtilen koordinatlara giderek örneği şişesinden çekmekte ve loop vasıtasıyla mobil faza enjekte etmektedir. Carousel tipinde ise örnekler dönen, dairesel şekilli bir taşıyıcı vasıtasıyla sabit bir enjektörün altına taşınmaktadır (Kılınç, 2010).

Kolon

Kompleks örneklerde, bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayrımından sorumlu sabit fazdır. Kolon üretiminde; 316 paslanmaz çelik, TEFLON, cam veya PEEK en sık tercih edilen materyallerdir. Kullanılan malzemeler çok çeşitli olup; kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak HPLC metodunun özelliklerine ve analizi yapılacak örneğin kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilmelidir. Seçilecek kolonun HPLC uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Ticari olarak 3 temel kolon grubu mevcut olup,

yapılacak seçimde bu kolonlar ile optimum olarak hangi grup kimyasal maddelerin ayrımının yapılabildiğine dikkat edilmelidir. Ters faz kolonlar; apolar, ortapolar, polar bileşikler, zayıf asit ve bazlar, proteinler, peptidler, kuvvetli organik asit ve bazlar için daha uygundur. C18/RP18/ODS, Phenyl, C8, C4, C2, TMS bu grupta yer alır. Normal faz kolonlar, genelde suda çözünmeyen organik bileşikler, izomerler için daha uygundur. $-CN$, $-NH_2$, $-NO_2$, DIOL bu grupta yer alır. İyon değiş tokuş kolonları; bu tip kolonlardan $-SO_3H$ kuvvetli katyonlar için, $-NR_3$ kuvvetli anyonlar için, $-COOH$ zayıf katyonlar için ve son olarak $-NR_2$ ise zayıf anyonlar için daha uygundur (Kılınç, 2010).

Dedektör

HPLC donanımında 4 temel bileşenden birisi olan dedektör, örnek bileşenlerini tayin ederken fiziksel özelliğe gruplandırılabilir. Dedektör donanımına ait genel özellikler Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry–IUPAC) tarafından tanımlanan birimler (sıcaklık aralığı, basınç, akış hızı vb.) kullanılarak verilmektedir. UV/görünür bölge (UV/Vis) dedektörü; Lambert–Beer Kanunu’nu prensibine göre çalışır ve zamana karşı absorbans ölçülür. Genellikle tek veya en fazla iki farklı dalga boyunda eş zamanlı ölçüm yapılabilmektedir. Ekonomik olması ve geniş uygulama alanına sahip olması nedeniyle en sık kullanılan dedektördür. Buna ek olarak, bakım ve kullanımının kolay olması da tercih nedenlerindendir. Çoklu fotodiyod dedektörü (Photodiode Array–PDA); UV/Vis dedektörle aynı çalışma prensibine sahiptir, yani zamana karşı absorbans ölçülür. Bu anlamda, UV/Vis dedektörün geliştirilerek modifiye edilmiş versiyonudur. PDA dedektöründe farklı olarak, tüm dalga boylarında eş zamanlı ve anlık spektrum alabilme özelliğine sahiptir. Bu özelliği nedeniyle kromatogramda yer alan tüm piklerin arzu edilen dalga boyu aralığındaki spektrumlarını da gösteren üç boyutlu kromatogramlara sahiptir ve bu sayede kompleks örneklerde pik teşhislerinin daha sağlıklı şekilde yapılabilmesine olanak sağlar. Floresans (fluorescence) dedektörü; belirli dalga boyunda uyarılan maddelerin temel hale dönerken yaydığı floresans emisyonunun ölçümü zamana karşı yapılmaktadır. Kısıtlı sayıda madde grubuna uygulanabilir. Tayin sınırı açısından en hassas dedektörlerdendir. İletkenlik (conductivity) dedektörü; kondüktometre ile benzer prensipte çalışan bu dedektörde iletkenlik (μS) monitorize edilerek tayinler gerçekleştirilmekte olup, sistem sıcaklık değişimlerine karşı oldukça duyarlıdır.

Refraktif indeks (refractive index) dedektörü, analizlenecek madde üzerine yollanan ve kırılan ışığın kırılma açısı üzerinden tayin yapılmaktadır (Kılınç, 2010).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Malzeme

Tez çalışması kapsamında, iki farklı kuru üzüm türü kullanılmıştır. Kuru üzümlerden birincisi sarı renkli İzmir kuru üzümü; ikincisi ise siyah renkli Adıyaman kuru üzümüdür. Bu çalışmada kontrol besiortamı olarak, Malt Extract Agar (MEA) besiortamı kullanılmıştır. Küf izolasyonu için MEA ve Dichloran Glycerol Agar (DG18) besiortamları kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan küf suşları ise; siyah kuru üzümünden ve sarı kuru üzümünden izole edilmiş olan iki farklı siyah *Aspergillus* suşudur. Suşlardan birincisi *A.niger* ve ikincisi *A.carbonarius* türlerine ait suşlardır.

3.2 Yöntem

Bu bölümde, tez çalışmasına ait gerçekleştirilen deneylerde uygulanan işlem basamakları alt başlıklara ayrılarak anlatılmıştır.

3.2.1 Besiortamlarının hazırlanması

Tez çalışmasında; MEA, DG18, siyah üzüm kullanılarak hazırlanan besiortamı ve sarı üzüm kullanılarak hazırlanan besiortamı olmak üzere dört farklı besiortamı kullanılmıştır. MEA besiortamı hazırlanırken; erlenmayer içine gerekli miktarda besiortamı hassas terazide tartılarak eklendikten sonra, üzerine gerekli miktarda distile su eklemiştir. MEA besiortamının hazırlanmasında kullanılan oran şu şekildedir: 1L distile suda 48 g besiortamı tartılıp çözündürülmelidir. Besiortamına su eklenmesi işleminin ardından, besiortamının suda tamamen ve homojen olarak çözünmesini sağlamak için mikrodalgada çözündürme işlemi yapılmıştır. Köpürme ve taşmayı engellemek amacıyla erlenmayer pamuk ile kapatılmıştır. Çözünme işlemi, çözelti berraklaşmaya kadar sürdürülmüştür. Çözelti homojen olarak elde edildikten sonra, MEA içeren erlenmayer üzerinde bulunan pamuk alüminyum folyo

ile kapatılmıştır. Besiortamı 121°C’de 10 dakika süreyle otoklav edilmiştir. Besiortamları, otoklav sonrasında petrilere dökülüp donmak üzere bekletilmiştir. DG18 besiortamı hazırlanırken; erlenmayer içine gerekli miktarda besiortamı hassas terazide tartılarak eklendikten sonra, üzerine gerekli miktarda distile su eklenmiştir. DG18 besiortamının hazırlanmasında kullanılan oran şu şekildedir: 1L distile suda 31.6 g DG18 besiortamı tartılıp çözündürülmelidir. Besiortamına su eklenmesi işleminin ardından, besiortamının suda tamamen ve homojen olarak çözünmesini sağlamak için mikrodalgada çözündürme işlemi yapılmıştır. 1L çözeltiye 175 mL oranında gliserol eklenmiştir. Köpürme ve taşmayı engellemek amacıyla erlenmayer pamuk ile kapatılmıştır. Çözünme işlemi, çözelti berraklaşınca kadar sürdürülmüştür. Çözelti homojen olarak elde edildikten sonra, MEA içeren erlenmayer üzerinde bulunan pamuk alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Besiortamı 121°C’de 15 dakika süreyle otoklav edilmiştir. Besiortamları, otoklav sonrasında petrilere dökülüp donmak üzere bekletilmiştir. Siyah kuru üzüm ve sarı kuru üzüm kullanılarak hazırlanan besiortamları her iki kuru üzüm cinsi için de aynı yöntem kullanılarak hazırlanmıştır (Mateo ve diğ, 2009). 1L distile su için 150 g kuru üzüm ve 20 g agar agar, oranına uygun olarak kuru üzümlü besiortamları hazırlanmıştır. Kuru üzümler ayrı ayrı tartılıp üzerlerine distile su eklendikten sonra blender’da 2 dakika süreyle yüksek hızda karıştırılmıştır. Elde edilen karışımlar beherlere alınıp üzerlerine %2 oranında agar agar eklenmiştir. Beherlere manyetik karıştırıcı atıldıktan sonra elektrikli ısıtıcı (hot plate) üzerinde; 500 rpm hızında, 100°C sıcaklıkta, 45 dakika süreyle karıştırılmıştır. Karıştırma tamamlandıktan sonra, manyetik karıştırıcı uzaklaştırılmıştır. Besiortamları süzgeç yardımıyla erlenmayerlere süzölmüştür. Erlenmayerler, köpürme ve taşmayı engellemek amacıyla, pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Besiortamları, 115°C’de 30 dakika süreyle otoklav edilmiştir. Otoklav sonrası besiortamları petrilere dökülüp donması beklenmiştir.

3.2.2 Siyah *Aspergillus* suşlarının izolasyonu

MEA besiortamı ve DG18 besiortamı hazırlanıp otoklav edildikten sonra steril petrilere besiortamları dökölmüştür. Besiortamları petrilere donması beklendiği sırada, dilüsyonlar hazırlanmıştır. Dilüsyonların hazırlanmasında kullanılan peptonlu su; 1 g pepton, 8.5 g NaCl ve 1L distile su formölasyonuna göre hazırlanmıştır. Peptonlu su çözeltisinden herbir deney tüpünde 9 mL solvent olacak şekilde peptonlu

su deney tüplerine paylaştırılmıştır. 25 g sarı kuru üzüm örneği ve 25 g siyah kuru üzüm örneği, alevin yanında Stomacher poşetlerinin içinde tartılıp herbirinin üzerine ayrı ayrı 225 mL peptonlu su çözeltisi eklenmiştir. Stomacher poşetlerinin ağzı kapatılıp 120 saniye boyunca Stomacher cihazında çalkalanmıştır. Bunun sonucunda -1 numaralı dilüsyon hazır olmuştur. -1 numaralı dilüsyondan 1 mL alınıp, 9 mL peptonlu su içeren deney tüpüne aktarılmıştır. Bu süspansiyon, vortex cihazı kullanılarak karıştırılmıştır. Bu işlem sonucunda -2 numaralı dilüsyon hazır olmuştur. -2 numaralı dilüsyondan 1 mL alınıp, 9 mL peptonlu su içeren deney tüpüne aktarılmıştır. Bu süspansiyon, vortex cihazı kullanılarak karıştırılmıştır. Bu işlem sonucunda -3 numaralı dilüsyon hazır olmuştur. -3 numaralı dilüsyondan 1 mL alınıp, 9 mL peptonlu su içeren deney tüpüne aktarılmıştır. Bu süspansiyon, vortex cihazı kullanılarak karıştırılmıştır. Bu işlem sonucunda -4 numaralı dilüsyon hazır olmuştur. Tüm dilüsyonlar hazırlandıktan sonra, yayma ekim yöntemi kullanılarak inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Herbir dilüsyondan 0.1 mL'şer alınıp besiortamlarına inokule edilmiştir. Drigalski spatülü kullanılarak tüm petrilere yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kuru üzümler doğrudan petrilere inokule edilmiştir. Bu inokulasyon 1 petrinin 4 köşesinde birer tane kuru üzüm tanesi olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. MEA besiortamına siyah üzümünden hazırlanan dilüsyonlar; DG18 besiortamına sarı üzümünden hazırlanan dilüsyonlar inokule edilmiştir. Tüm ekim işlemleri tamamlandıktan sonra, tüm petriler 25°C'de 7 gün süreyle etüvde inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonrası petrilere örnek spor alınıp, tek koloni elde etmek için tekrar ekim yapıp 25°C'de 5 gün süreyle etüvde inkubasyona bırakılmıştır. İkinci inkubasyon sonrasında küflerin identifikasyonu yapılmıştır. Bu identifikasyon sonucunda DG18 besiortamına inokule edilen sarı kuru üzümünden izole edilen küf türü *A.niger* olarak; MEA besiortamına inokule edilen siyah kuru üzümünden izole edilen küf türü *A.carbonarius* olarak identifiye edilmiştir.

3.2.3 Küf spor süspansiyonunun hazırlanması

Küf spor süspansiyonunun hazırlanması için Tween 80 çözeltisi hazırlanmıştır. Tween 80 çözeltisinin formülasyonu; 8.5 g tuz, 1 g pepton, 1 mL Tween 80 ve 1L distile su şeklindedir. Bu tez çalışmasında kullanılan kuru üzümlerden izole edilmiş olan *A.niger* ve *A.carbonarius* suşları MEA yatık agar besiortamına öze yardımıyla sürme ekim yöntemi kullanılarak alınmıştır. 7 günlük inkubasyon sonunda, küf sporları yatık agardan alınıp Tween 80 çözeltisine aşılanmıştır. Bu çözeltide küf

sporlarının homojen dağılımını sağlamak için vortex kullanılmıştır. Otomatik pipet kullanılarak çözeltiden 30 µL örnek alınıp Thoma lamına aktarılmıştır. Thoma lamı üzerine lamel kapatılıp, Thoma lamı mikroskoba konularak spor sayımı yapılmıştır. Mikroskopta sayım yapılırken; mikroskop ışık şiddeti ayarı 4x ve objektif ayarı 10x olacak şekilde görüntünün yeri bulunduktan sonra; sayım yapılırken ışık şiddeti 40x olacak şekilde ayarlanmıştır. Küf spor süspansiyonundaki spor sayısı 10^6 spor/mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.4 İnokulasyon, inkubasyon ve örneklerin hazırlanması

Konsantrasyonu 10^6 spor/mL'ye ayarlanmış olan küf spor süspansiyonundan otomatik pipet yardımıyla 2 µL besiyortamlarına inokule edilmiştir. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra, tüm petriler 25°C'de 10 gün süreyle etüvde inkube edilmiştir. 10 günlük periyot boyunca her gün besiyortamının küf kolonisi içermeyen, koloninin alt bölgesine denk gelen 3 nokta alınarak örnekler, daha önceden 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiş viallere aktarılmıştır.

3.2.5 HPLC analizi için gerekli solventlerin, örneklerin hazırlanması ve HPLC ölçümleri

HPLC cihazında OTA analizi yapmak için kullanılması gereken mobil faz; asetonitril:distile su: asetik asit mobil fazıdır. Mobil faz; asetonitril:distile su:asetik asit (99 mL: 99 mL: 2 mL, v/v/v) oranına uygun olarak hazırlanmıştır. Mobil faz çözeltisinin karışımı hazırlandıktan sonra süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sartolon 25006-47-N (0.45 µm) filtre kağıdı kullanılarak, nuçe erleninde süzme yapılmıştır. Nuçe erlenine trompun hortumu bağlandıktan sonra erlenin üzerine nuçe hunisi ve süzgeç kağıdı yerleştirilmiştir. Tromp çalıştırılıp vakum yapıldıktan sonra, mobil faz nuçe erleninden süzölmüştür. Süzme işlemi sonrasında, mobil faz ultrasonik su banyosunda 2 dakika süreyle degassing işleminden geçirilmiştir. Bui şlemin amacı çözeltideki hava kabarcıklarını uzaklaştırarak kolonda oluşabilecek analiz hatasını engellemektir.

Kolondaki safsızlıkları giderebilmek için metanol:distile su çözeltisi kullanılır. Bu çözelti metanol: distile su (70 mL: 30 mL, v/v) oranına uygun olarak hazırlanmıştır. Örneklerin HPLC'de OTA ölçümü için hazırlanmasında kullanılan ekstraksiyon solventi metanol: distile su (75 mL: 25 mL, v/v) oranına uygun olarak hazırlanmıştır.

HPLC cihazında OTA analizi yapılırken, kalibrasyon grafiğinin oluşturulabilmesi için 6 farklı konsantrasyonda OTA standart çözeltileri hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan OTA standart çözeltilerinin konsantrasyonlarına ait değerler Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan OTA standardı, Supelco marka, benzen:asetik asit (99:1, v/v) içindeki, 50 µg/mL konsantrasyonlu OTA standardıdır.

Çizelge 3.1 : Farklı konsantrasyonlarda OTA standart çözeltileri.

Standart konsantrasyonu: 50 ng/mL		
Çözelti konsantrasyonu (ng/mL)	Standarttan alınan miktar (µL)	İlave solvent (asetonitril:distile su:asetik asit) (µL)
30	3	4997
20	2	4998
10	1	4999
8	0.8	5000
5	0.5	5000
2	0.2	5000

Steril vialler içinde bulunan herbir örneğin üzerine ayrı ayrı 750 µL ekstraksiyon solventi (metanol:distile su) eklenmiştir. Tüm vialler 30 saniye süreyle vortex cihazında karıştırılmıştır. Vortex cihazında karıştırma işlemi sonrası tüm vialler mekanik çalkalayıcıda 50 dakika süreyle çalkalanmıştır. Mekanik çalkalayıcıdaki işlem sonrası tüm viallerde bulunan örnekler filtrasyon işlemi uygulanarak katı partiküller uzaklaştırılmıştır. Tüm örnekler HPLC cihazına enjekte edilmek üzere hazırlanmıştır.

HPLC cihazında örnek ölçümlerine başlamadan önce modüller açıldıktan sonra akış hızı 5 mL/dakika olacak şekilde 5 dakika boyunca purge işlemi yapılmıştır. Bu işlem sonunda akış hızı 1 mL/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Mobil faz, spektrum çizgisi (baseline) düzleşinceye kadar kolondan geçirildikten sonra örneklerin analizlerine başlanmıştır. İlk olarak standart çözeltilerinden herhangi bir tanesi cihaza enjekte edilip alıkonma süresi belirlenmiştir. Bu değer kalibrasyon grafiği alanında bulunan alıkonma süresi hanesine kaydedilmiştir. OTA analizi için kolonda alıkonma süresi yaklaşık olarak 11 dakika olarak belirlenmiştir. Herbir enjeksiyon için 20 µL örnek kullanılmıştır. HPLC ile OTA analizi dörtlü çözgen dağıtım sistemi, 20 µL’lik döngü içeren Rheodyne enjeksiyon sistemi, floresans dedektör ($\lambda_{Ex}=333$ nm; $\lambda_{Em}=460$ nm; sıcaklık: 30°C), degasser ünitesi içeren Agilent 1100 Series HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. OTA ayrımı, 30°C sıcaklıkta ODS–C18

Hypersil 250 mm×4.6 mm, 5 µm partikül çaplı ters faz kolonda 1 mL/dakika akış hızında gerçekleştirilmiştir. Tüm örneklerle ait kromatogramlar, alıkonma süreleri ve OTA miktarları belirlenmiştir.

3.2.6 pH değerlerinin ölçümü

Konsantrasyonu 10^6 spor/mL'ye ayarlanmış olan küf spor süspansiyonundan otomatik pipet yardımıyla 2 µL besiortamlarına inokule edilmiştir. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra, tüm petriler 25°C'de 10 gün süreyle etüvde inkube edilmiştir. 10 günlük periyot boyunca her gün besiortamının küf kolonisi içermeyen ve besiortamının alt bölgesinden HPLC analizi için alınan 3 nokta örneklerin haricinde kalan tüm besiortamları pH değerlerinin ölçümü için kullanılmıştır. Besiortamları spatül yardımıyla 25 mL'lik beherlere alınıp, mikrodalgada besiortamı sıvı faza geçirilmiştir. Besiortamı katılaşmadan bir süre soğutulmuştur. Bu süre içinde pH-metrenin probunun ucu distile su ile temizlenmiştir. Daha sonra pH-metre probu behere daldırılarak besiortamlarının pH değerleri kaydedilmiştir. pH ölçümü, pH-metrenin okuduğu değer sabitleninceye kadar beklendikten sonra; sabitlenmiş olan değer, okunan örneğin pH değeri olarak kaydedilmiştir. 10 günlük inkubasyon periyodu boyunca, her gün örneklerin pH değeri ölçümleri yapılmıştır.

3.2.7 Küf gelişim hızlarının ölçümü

Konsantrasyonu 10^6 spor/mL'ye ayarlanmış olan her iki suşa ait (*A.niger* ve *A.carbonarius*) küf spor süspansiyonlarından otomatik pipet yardımıyla 2 µL, MEA besiortamlarına inokule edilmiştir. Ekim işlemleri tamamlandıktan sonra petriler 25°C ve 30°C olmak üzere iki farklı sıcaklık değerinde 10 günlük süreyle etüvde inkubasyona bırakılmıştır. Bu 10 günlük periyot boyunca her gün düzenli olarak petrilerdeki küf koloni çapı değerleri cetvel yardımıyla ölçülüp, elde edilen değerler kaydedilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Küf Spor Süspansiyonunun Hazırlanması ve Spor Sayımı

Malzeme–yöntem bölümünde anlatıldığı gibi, küf spor süspansiyonunun hazırlanmasında Thoma lamında sayım yapılmıştır. Thoma lamında sayım yapılırken; mikroskopta görüntünün yerinin bulunmasında ışık şiddeti 4x ve objektif 10x olacak şekilde ayarlanıp; görüntü bulunduktan sonra, küf sporu sayım aşamasında ışık şiddeti 40x olarak kullanılmıştır. Thoma lamı üzerine hazırlanmış olan 30 µL’lik örnekteki spor sayısı bulunurken; Şekil 4.1’de gösterilen Thoma lamında sayım yapılan bölgelere ait şablonda numaralandırılan bölgeler, numara sırasıyla sayım yapılmıştır.

1			2
	4	3	
	5	6	
8			7

Şekil 4.1: Thoma lamı sayımında sayım yapılan bölgeler.

Sayım yapılan her bir bölgedeki spor sayısı belirlendikten sonra denklem 4.1 ile gösterilen formül kullanılarak spor süspansiyonunun konsantrasyonu belirlenmiştir.

$$(8 \text{ karedeki toplam spor sayısı} \times 2) \times 10^4 = \text{spor sayısı/mL} \quad (4.1)$$

Şekil 4.1 ile gösterilen şablonda 8 kare bölgesi sayıldıktan sonra bulunan değer 2 ile çarpılarak, sayılmamış karelerden gelen spor sayısı da hesaplanmış olur. Elde edilen sonuç değeri, 10^4 ile çarpılarak 1 mL'deki spor sayısı bulunmuştur. (8 karedeki toplam spor sayısı $\times$ 2) ile bulunan değer, 0.1 mm^3 'lük örnekteki küf sporu sayısını gösterdiği için, 1 mL'deki spor sayısını bulmak amacıyla 10^4 ile çarpılmıştır. Thoma lamında sayım sonucunda 8 karedeki toplam küf sporu sayısı, *A.niger* suşu için, 261 ve *A.carbonarius* için 355 olarak bulunmuştur. Denklem 4.1 kullanılarak;

$$(261 \times 2) \times 10^4 = 522 \times 10^4 \text{ spor/mL} \sim 5 \times 10^6 \text{ spor/mL olarak hesaplanmıştır.}$$

$$(355 \times 2) \times 10^4 = 710 \times 10^4 \text{ spor/mL} \sim 7 \times 10^6 \text{ spor/mL olarak hesaplanmıştır.}$$

Tez çalışmasında kullanılmak üzere hazırlanmış olan küf spor süspansiyonlarından; *A.niger* suşu için konsantrasyon 5×10^6 spor/mL ve *A.carbonarius* 7×10^6 spor/mL olarak ayarlanmıştır. Konsantrasyonu ayarlanmış olan spor süspansiyonları inokulasyon öncesi vortexlendikten sonra herbir petriye 2 μL örnek gelecek şekilde inokule edilmiştir.

4.2 HPLC'de OTA Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

HPLC cihazında OTA analizi yapılmadan önce 50 ng/mL standart çözeltisi kullanılarak 6 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin konsantrasyonları 2 ng/mL, 5 ng/mL, 8 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL ve 30 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonların hazırlanması için gerekli standart çözelti ve solvent miktarlarının belirlenmesine ait hesaplamalar aşağıda belirtilmiştir:

Standart çözelti 1: 2 ng/mL konsantrasyon için;

OTA standart çözeltisinin konsantrasyonu: 50 $\mu\text{g/mL}$, eklenecek solvent miktarı 5mL=5000 μL ve 2 ng/mL konsantrasyon elde etmek için kullanılacak standart miktarı a_1 olmak üzere;

$$\frac{50 \mu\text{g}}{\text{mL}} = \frac{50 \times 10^3 \text{ ng}}{\text{mL}} \Rightarrow \frac{50 \times 10^3 \text{ ng}}{\text{mL}} \times \frac{a_1 \mu\text{L}}{5000 \mu\text{L}} = 2 \text{ ng/mL} \Rightarrow a_1 = 0.2 \mu\text{L}$$

Konsantrasyonu 2 ng/mL olan OTA standart çözeltisini hazırlamak için 0.2 μL standart üzerine, 5000 μL solvent eklenmiştir.

Standart çözelti 2: 5 ng/mL konsantrasyon için;

OTA standart çözeltisinin konsantrasyonu: 50 µg/mL, eklenecek solvent miktarı 5mL=5000 µL ve 5 ng/mL konsantrasyon elde etmek için kullanılacak standart miktarı a₂ olmak üzere;

$$\frac{50 \mu g}{mL} = \frac{50 \times 10^3 ng}{mL} \Rightarrow \frac{50 \times 10^3 ng}{mL} \times \frac{a_2 \mu L}{5000 \mu L} = 5 ng/mL \Rightarrow a_2 = 0.5 \mu L$$

Konsantrasyonu 5 ng/mL olan OTA standart çözeltisini hazırlamak için 0.5 µL standart üzerine, 5000 µL solvent eklenmiştir.

Standart çözelti 3: 8 ng/mL konsantrasyon için;

OTA standart çözeltisinin konsantrasyonu: 50 µg/mL, eklenecek solvent miktarı 5ml=5000 µL ve 8 ng/mL konsantrasyon elde etmek için kullanılacak standart miktarı a₃ olmak üzere;

$$\frac{50 \mu g}{mL} = \frac{50 \times 10^3 ng}{mL} \Rightarrow \frac{50 \times 10^3 ng}{mL} \times \frac{a_3 \mu L}{5000 \mu L} = 8 ng/mL \Rightarrow a_3 = 0.8 \mu L$$

Konsantrasyonu 8 ng/mL olan OTA standart çözeltisini hazırlamak için 0.8 µL standart üzerine, 5000 µL solvent eklenmiştir.

Standart çözelti 4: 10 ng/mL konsantrasyon için;

OTA standart çözeltisinin konsantrasyonu: 50 µg/mL, eklenecek solvent miktarı 4.999 mL=4999 µL ve 10 ng/mL konsantrasyon elde etmek için kullanılacak standart miktarı a₄ olmak üzere;

$$\frac{50 \mu g}{mL} = \frac{50 \times 10^3 ng}{mL} \Rightarrow \frac{50 \times 10^3 ng}{mL} \times \frac{a_4 \mu L}{5000 \mu L} = 10 ng/mL \Rightarrow a_4 = 1 \mu L$$

Konsantrasyonu 10 ng/mL olan OTA standart çözeltisini hazırlamak için 1 µL standart üzerine, 4999 µL solvent eklenmiştir.

Standart çözelti 5: 20 ng/mL konsantrasyon için;

OTA standart çözeltisinin konsantrasyonu: 50 µg/mL, eklenecek solvent miktarı 4.998 mL=4998 µL ve 20 ng/mL konsantrasyon elde etmek için kullanılacak standart miktarı a₅ olmak üzere;

$$\frac{50 \mu g}{mL} = \frac{50 \times 10^3 ng}{mL} \Rightarrow \frac{50 \times 10^3 ng}{mL} \times \frac{a_5 \mu L}{5000 \mu L} = 20 ng/mL \Rightarrow a_5 = 2 \mu L$$

Konsantrasyonu 20 ng/mL olan OTA standart çözeltisini hazırlamak için 2 µL standart üzerine, 4998 µL solvent eklenmiştir.

Standart çözelti 6: 30 ng/mL konsantrasyon için;

OTA standart çözeltisinin konsantrasyonu: 50 µg/mL, eklenecek solvent miktarı 4.997 mL=4997 µL ve 30 ng/mL konsantrasyon elde etmek için kullanılacak standart miktarı a₆ olmak üzere;

$$\frac{50 \mu g}{mL} = \frac{50 \times 10^3 ng}{mL} \Rightarrow \frac{50 \times 10^3 ng}{mL} \times \frac{a_6 \mu L}{5000 \mu L} = 30 ng/mL \Rightarrow a_6 = 3 \mu L$$

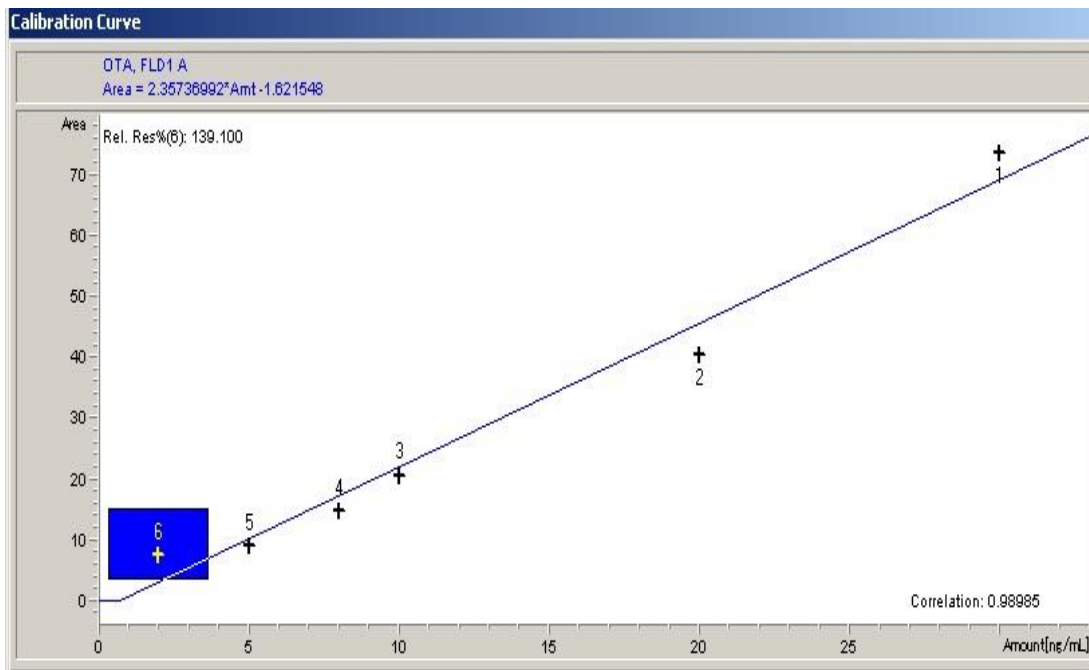
Konsantrasyonu 30 ng/mL olan OTA standart çözeltisini hazırlamak için 3 µL standart üzerine, 4997 µL solvent eklenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda OTA standart çözeltilerinin hazırlanması sırasında; OTA standardından ve üzerine eklenecek solventten kullanılacak miktarlar 3.bölümde Çizelge 3.1’de toplu olarak gösterilmiştir.

4.3 HPLC’de OTA Analizi Sonuçları

4.3.1 HPLC kalibrasyon grafiği

HPLC cihazında OTA analizi yapılırken; örneklerin okunmasından önce farklı konsantrasyonlarda hazırlanan OTA standart çözeltileri okunarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. HPLC cihazında OTA analizine ait oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2: HPLC OTA analizine ait kalibrasyon grafiği.

Şekil 4.2’de gösterilen kalibrasyon grafiğine ait R^2 değeri, $R^2=0.98985$ ’tir. Kalibrasyon grafiği çizilirken kullanılan miktar ve alan değerleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 : HPLC OTA analizi kalibrasyon grafiği verileri.

Miktar (ng/mL)	Alan
2	7.396
5	8.899
8	14.616
10	20.550
20	40.351
30	73.640

4.3.2 HPLC grafikleri

A.niger ve *A.carbonarius* suşlarının MEA besiortamı, sarı kuru üzüm kullanılarak oluşturulan besiortamı ve siyah kuru üzüm kullanılarak oluşturulan besiortamı olmak üzere 3 farklı besiortamında 10 günlük inkubasyonu sonucunda HPLC’de OTA analizine hazırlanan tüm örnekler HPLC cihazında analizlenmiştir. Elde edilen kromatogramlardan OTA miktarları hesaplaması yapılmıştır.

4.3.3 LOD ve LOQ hesaplaması

HPLC cihazında ölçümlerin hassasiyetini belirlemek için LOD (limit of detection–tespit limiti) ve LOQ (limit of quantification–tayin limiti) değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin hesaplanması için 0.2 ng/mL konsantrasyonda OTA standart çözeltisinin 3 kez cihazda okuması yapılmıştır. Bu okumalara karşılık gelen miktar verileri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir

Çizelge 4.2 : LOD ve LOQ değerleri için gerekli veriler.

Okuma sayısı	OTA standart konsantrasyonu (ng/mL)	Cihazda okunan değer (ng/mL)
1	0.2	0.3825
2	0.2	0.2858
3	0.2	0.1785

HPLC cihazında okunan bu değerler kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında kullanılan formüller denklem 4.2, denklem 4.3 denklem 4.4 ve denklem 4.5 ile gösterilmiştir.

$$\text{Populasyon Ortalaması: } \mu = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (4.2)$$

$$\text{Standart sapma: } \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}} \quad (4.3)$$

$$\text{Limit of Detection (LOD): } \text{LOD} = \mu + 3\sigma \quad (4.4)$$

$$\text{Limit of Quantification (LOQ): } \text{LOQ} = \mu + 5\sigma \quad (4.5)$$

Yukarıda belirtilen denklemler kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

$$\mu = \frac{0.382523 + 0.285803 + 0.178506}{3} = 0.282277$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(0.382523 - 0.282277)^2 + (0.285803 - 0.282277)^2 + (0.178506 - 0.282277)^2}{3}} = 0.0833$$

$$\text{LOD} = \mu + 3\sigma = (0.282277) + (3 \times 0.0833)$$

LOD = 0.5321 olarak hesaplanmıştır.

$$\text{LOQ} = \mu + 5\sigma = (0.282277) + (5 \times 0.0833)$$

LOQ = 0.6987 olarak hesaplanmıştır.

4.3.4 HPLC’de örneklerde okunan OTA miktarları

A.niger ve *A.carbonarius* suşlarının OTA oluşturma miktarları HPLC’de analizlenmiştir. HPLC cihazında herbir örnek için okumalar tamamlandıktan sonra elde edilen kromatogramlar değerlendirilmiştir. Kromatogramlarda cihazın okuduğu değerlere ait gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra, örneklerdeki OTA miktarları belirlenmiş olup; çizelgelere aktarılmıştır. Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’te *A.carbonarius* ve *A.niger* suşlarının örneklerine ait HPLC cihazında okunan ve hesaplanan OTA miktarları belirtilmiştir.

A.niger suşunun sarı kuru üzümünden ve siyah kuru üzümünden elde edilen besiortamlarında OTA oluşturmadığı ve MEA besiyerinde OTA oluşturduğu belirlenmiştir.

A.carbonarius suşunun ise MEA besiortamında, sarı kuru üzümünden ve siyah kuru üzümünden elde edilen besiortamlarında OTA oluşturduğu belirlenmiştir. *A.carbonarius* suşunun örneklerine ait HPLC cihazında okunan ve hesaplanan OTA miktarları Çizelge 4.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 : *A.carbonarius* suşunun örneklerine ait OTA miktarları.

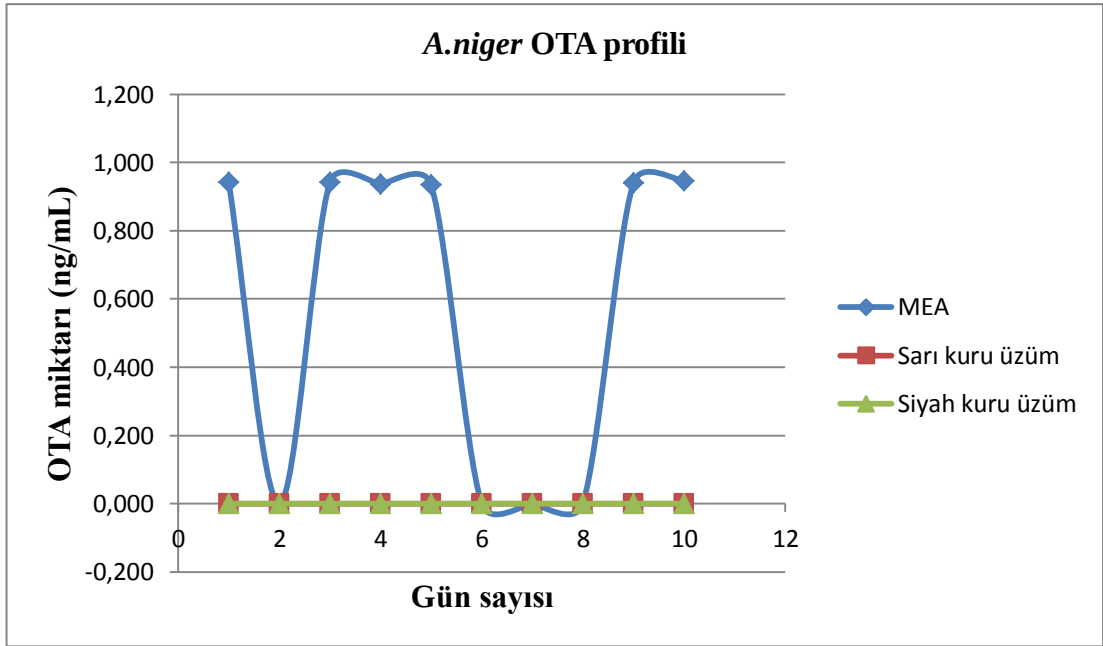
Örnek adı	Okunan miktar (ng/mL)	Hesaplanan miktar (ng/mL)
MEA- <i>A.carbonarius</i> -1.gün	0.838	1.118
MEA- <i>A.carbonarius</i> - 2.gün	0.000	0.000
MEA - <i>A.carbonarius</i> - 3.gün	0.802	1.069
MEA - <i>A.carbonarius</i> - 4.gün	0.968	1.290
MEA - <i>A.carbonarius</i> - 5.gün	0.781	1.041
MEA - <i>A.carbonarius</i> - 6.gün	0.834	1.112
MEA - <i>A.carbonarius</i> - 7.gün	0.764	1.019
MEA - <i>A.carbonarius</i> - 8.gün	0.751	1.001
MEA - <i>A.carbonarius</i> - 9.gün	0.000	0.000
MEA - <i>A.carbonarius</i> - 10.gün	0.779	1.038
SARI - <i>A.carbonarius</i> - 1.gün	0.756	1.008
SARI - <i>A.carbonarius</i> – 2.gün	0.868	1.157
SARI - <i>A.carbonarius</i> - 3.gün	0.763	1.017
SARI - <i>A.carbonarius</i> - 4.gün	0.867	1.156
SARI - <i>A.carbonarius</i> - 5.gün	0.868	1.158
SARI - <i>A.carbonarius</i> - 6.gün	1.057	1.410
SARI - <i>A.carbonarius</i> - 7.gün	0.933	1.244
SARI - <i>A.carbonarius</i> – 8.gün	0.808	1.078
SARI - <i>A.carbonarius</i> - 9.gün	0.806	1.075
SARI- <i>A.carbonarius</i> - 10.gün	0.787	1.049
SİYAH- <i>A.carbonarius</i> - 1.gün	0.756	1.009
SİYAH - <i>A.carbonarius</i> - 2.gün	0.761	1.015
SİYAH - <i>A.carbonarius</i> - 3.gün	0.782	1.043
SİYAH - <i>A.carbonarius</i> - 4.gün	1.664	2.219
SİYAH - <i>A.carbonarius</i> - 5.gün	0.971	1.295
SİYAH - <i>A.carbonarius</i> - 6.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.carbonarius</i> - 7.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.carbonarius</i> - 8.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.carbonarius</i> - 9.gün	0.000	0.000
SİYAH- <i>A.carbonarius</i> - 10.gün	0.000	0.000

A.niger suşunun örneklerine ait HPLC cihazında okunan ve hesaplanan OTA miktarları Çizelge 4.4’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 : *A.niger* suşunun örneklerine ait OTA miktarları.

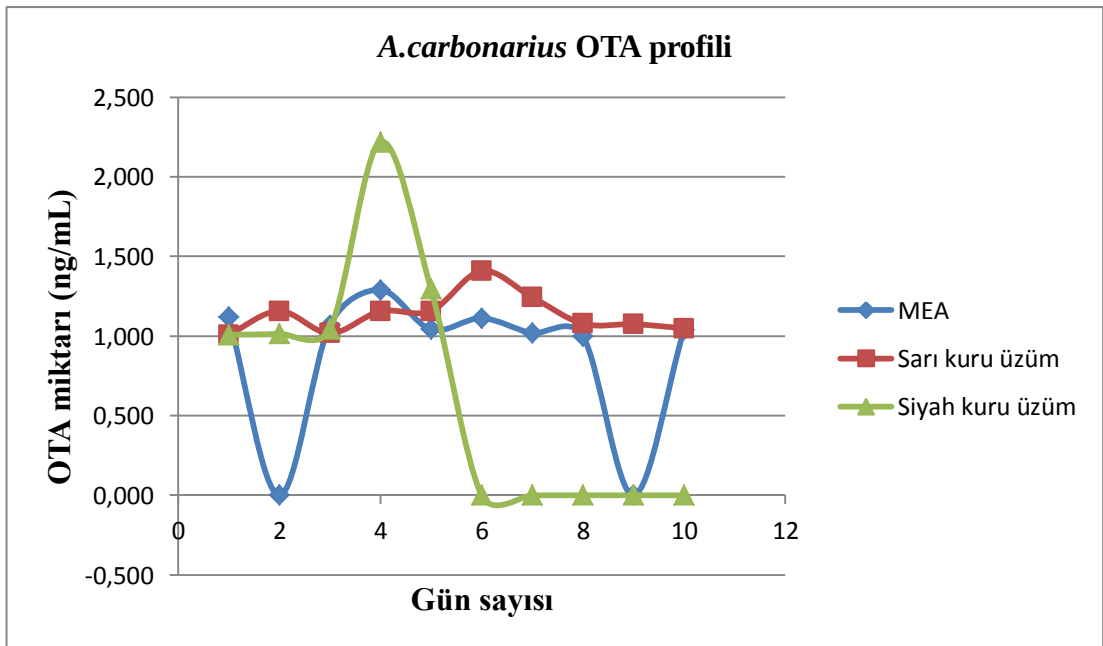
Örnek adı	Okunan miktar (ng/mL)	Hesaplanan miktar (ng/mL)
MEA - <i>A.niger</i> - 1.gün	0.707	0.943
MEA - <i>A.niger</i> - 2.gün	0.000	0.000
MEA - <i>A.niger</i> - 3.gün	0.706	0.942
MEA - <i>A.niger</i> - 4.gün	0.702	0.936
MEA - <i>A.niger</i> - 5.gün	0.701	0.935
MEA - <i>A.niger</i> - 6.gün	0.000	0.000
MEA - <i>A.niger</i> - 7.gün	0.000	0.000
MEA - <i>A.niger</i> - 8.gün	0.000	0.000
MEA - <i>A.niger</i> - 9.gün	0.705	0.940
MEA - <i>A.niger</i> - 10.gün	0.710	0.946
SARI - <i>A.niger</i> - 1.gün	0.000	0.000
SARI - <i>A.niger</i> - 2.gün	0.000	0.000
SARI - <i>A.niger</i> - 3.gün	0.000	0.000
SARI - <i>A.niger</i> - 4.gün	0.000	0.000
SARI - <i>A.niger</i> - 5.gün	0.000	0.000
SARI - <i>A.niger</i> - 6.gün	0.000	0.000
SARI - <i>A.niger</i> - 7.gün	0.000	0.000
SARI - <i>A.niger</i> - 8.gün	0.000	0.000
SARI - <i>A.niger</i> - 9.gün	0.000	0.000
SARI - <i>A.niger</i> - 10.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.niger</i> - 1.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.niger</i> - 2.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.niger</i> - 3.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.niger</i> - 4.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.niger</i> - 5.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.niger</i> - 6.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.niger</i> - 7.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.niger</i> - 8.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.niger</i> - 9.gün	0.000	0.000
SİYAH - <i>A.niger</i> - 10.gün	0.000	0.000

HPLC cihazında okunan değerler kullanılarak OTA miktarı hesaplanmıştır. *A.niger* suşunun 3 farklı besiortamındaki OTA profilleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 : *A.niger* suşunun 3 farklı besiortamındaki OTA profilleri.

A.carbonarius suşunun 3 farklı besiortamındaki OTA profilleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 : *A.carbonarius* suşunun 3 farklı besiortamındaki OTA profilleri.

4.4 Besiortamlarının pH Değerleri

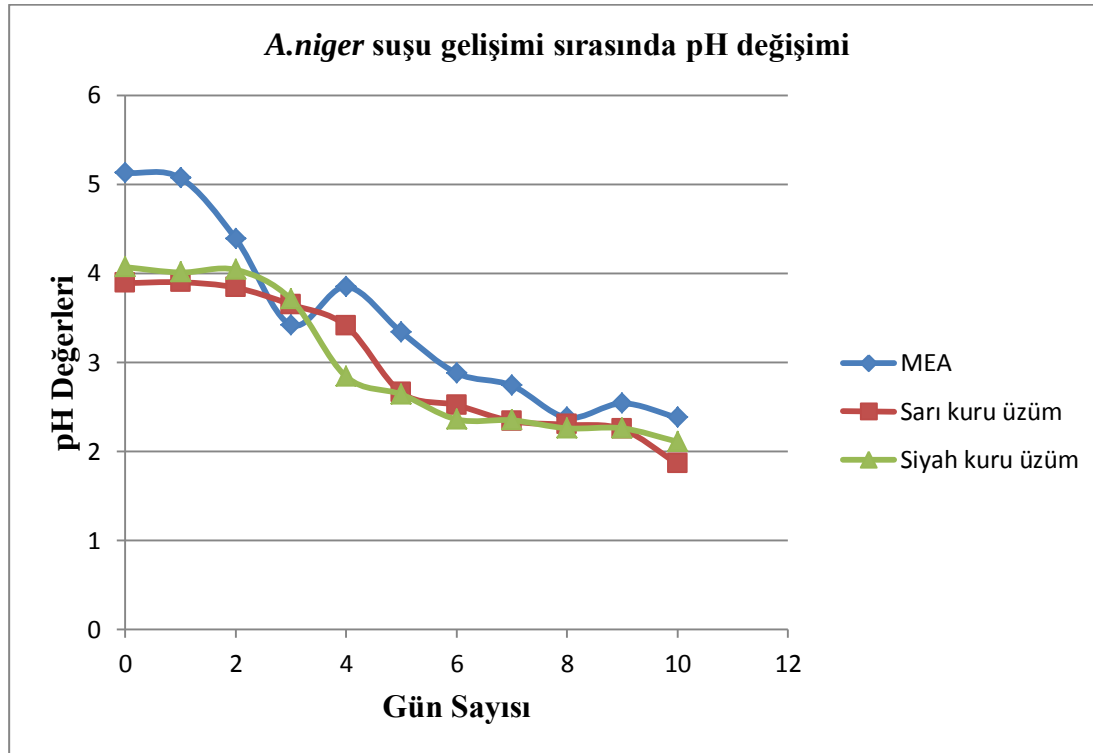
A.niger ve *A.carbonarius* suşlarının MEA besiortamında, sarı kuru üzüm kullanılarak hazırlanan besiortamında, siyah kuru üzüm kullanılarak hazırlanan besiortamında 10

günlük gelişme periyodu boyunca, besiortamlarının pH değerlerinde 0.günden 10.güne doğru gidildikçe azalma olduğu gözlemlenmiştir. *A.niger* suşunun inokule edilip geliştirildiği besiortamlarının 10 günlük pH değerleri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 : *A.niger* suşunun geliştiği besiortamlarındaki 10 günlük pH değerleri.

Gün Sayısı	MEA	Sarı kuru üzüm	Siyah kuru üzüm
0	5.13	3.89	4.07
1	5.07	3.90	4.01
2	4.39	3.84	4.04
3	3.42	3.65	3.71
4	3.85	3.41	2.84
5	3.34	2.66	2.64
6	2.88	2.52	2.36
7	2.74	2.34	2.35
8	2.38	2.30	2.26
9	2.54	2.25	2.26
10	2.38	1.86	2.11

A.niger suşunun 3 farklı besiortamında gelişimi sırasında besiortamlarında meydana gelen pH değişimlerinin zamana karşı grafiği Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5 : *A.niger* suşu gelişimi sırasında pH değişimlerinin zamana karşı grafiği.

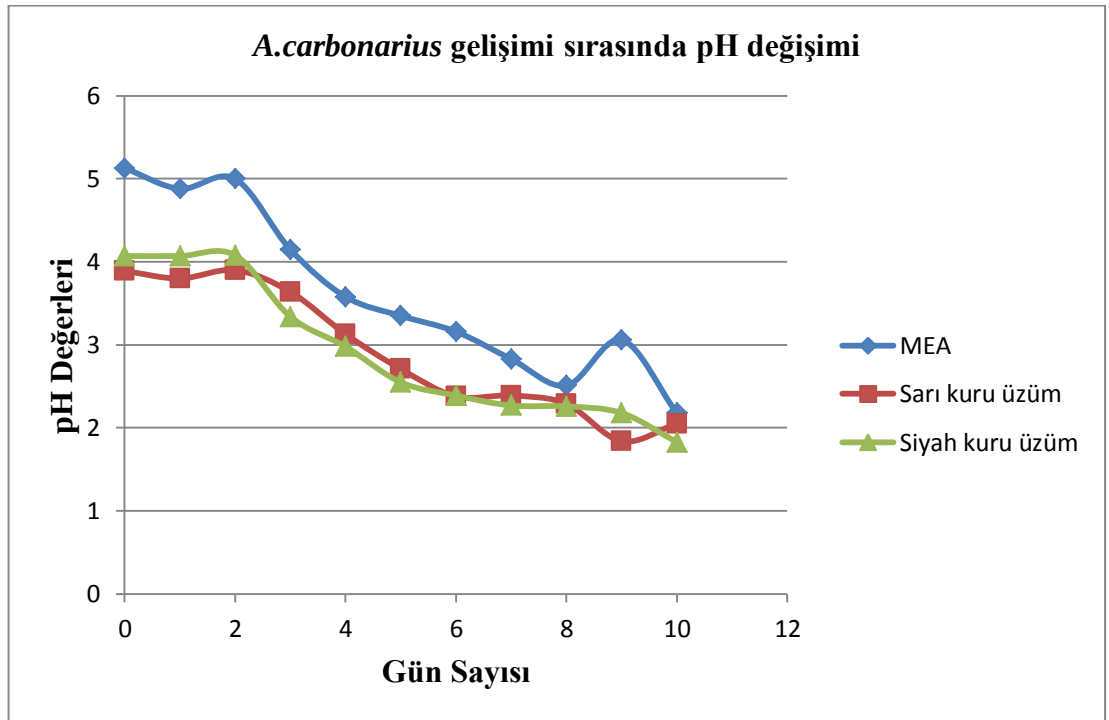
Şekil 4.5'teki grafikten de görülebileceği gibi, besiortamlarının pH değerlerinde 0. günden 10. güne doğru gidildikçe azalma olduğu gözlemlenmiştir.

A.carbonarius suşunun inokule edilip geliştirildiği besiortamlarının 10 günlük pH değerleri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 : *A.carbonarius* suşunun geliştiği besiortamlardaki 10 günlük pH değerleri.

Gün Sayısı	MEA	Sarı kuru üzüm	Siyah kuru üzüm
0	5.13	3.89	4.07
1	4.88	3.80	4.07
2	5.00	3.90	4.08
3	4.15	3.64	3.34
4	3.58	3.13	2.98
5	3.35	2.71	2.55
6	3.16	2.38	2.39
7	2.83	2.39	2.27
8	2.51	2.29	2.26
9	3.06	1.84	2.18
10	2.18	2.05	1.83

A.carbonarius suşunun 3 farklı besiortamında gelişimi sırasında besiortamlarında meydana gelen pH değişimlerinin zamana karşı grafiği Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 : *A.carbonarius* suşu gelişimi sırasında pH değişimlerinin zamana karşı grafiği.

Şekil 4.6'daki grafikten de görülebileceği gibi, besiortamlarının pH değerlerinde 0.günden 10.güne doğru gidildikçe azalma olduğu gözlemlenmiştir.

4.5 Küf Gelişim Hızlarının Belirlenmesi

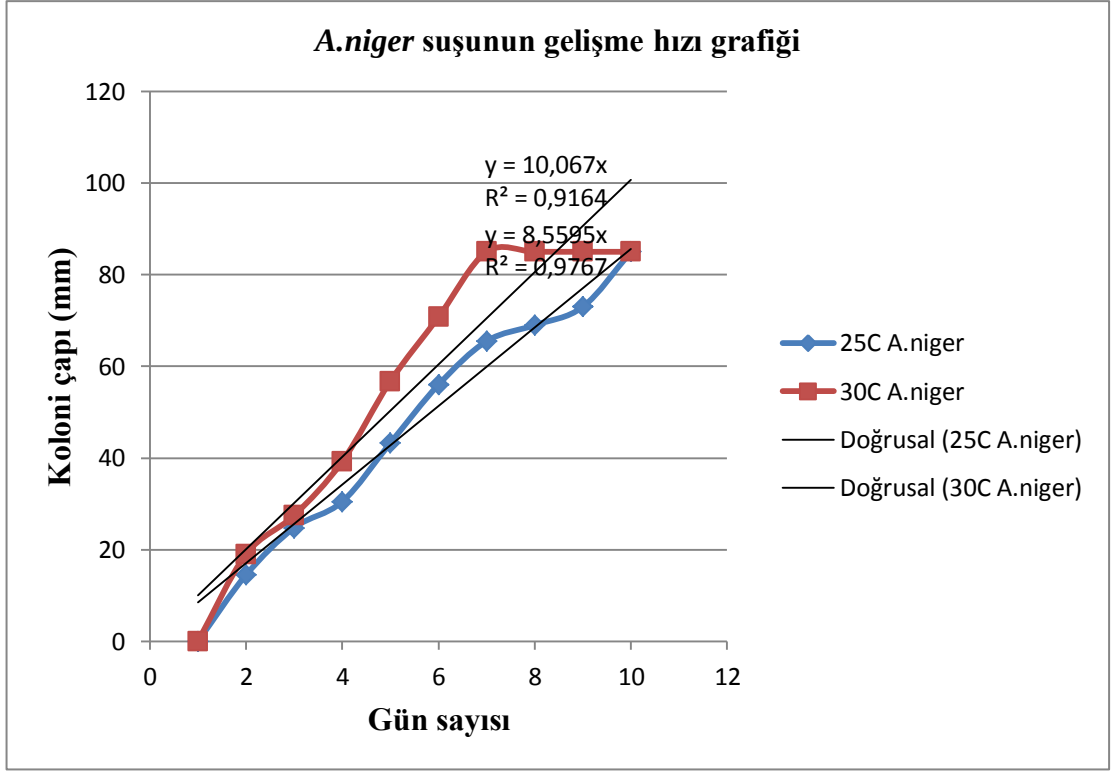
A.niger ve *A.carbonarius* suşlarının, gelişme hızlarının belirlenebilmesi için suşlar, MEA besiyerine ekilip; 25°C ve 30°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta inkube edilmiştir. 10 günlük inkubasyon periyodu boyunca her gün petrideki koloni çapları ölçülerek kaydedilmiştir. 10 günlük ortalama koloni çapları değerleri Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 : 10 günlük inkubasyon periyodunda koloni çapları değerleri.

Gün Sayısı	<i>A.niger</i>		<i>A.carbonarius</i>	
	25°C'deki çap değerleri (mm)	30°C'deki çap değerleri (mm)	25°C'deki çap değerleri (mm)	30°C'deki çap değerleri (mm)
1	0	0	0	0
2	14.5	19	14.5	22.5
3	24.8	27.5	23.3	32.5
4	30.5	39.25	31	45.8
5	43.3	56.75	44.8	62.5
6	56	70.75	55.5	80
7	65.5	85	70	85
8	69	85	72	85
9	73	85	73	85
10	85	85	85	85

Petrinin tüm yüzeyi 30°C'lik inkubasyonda 7.günden itibaren, 25°C'lik inkubasyonda 10.günde kaplanmış olup; tüm yüzey kaplandığında, koloni çapı ile petri çapı birbirine eşit ölçüde olmuştur. Petri çapı değeri 85 mm'dir.

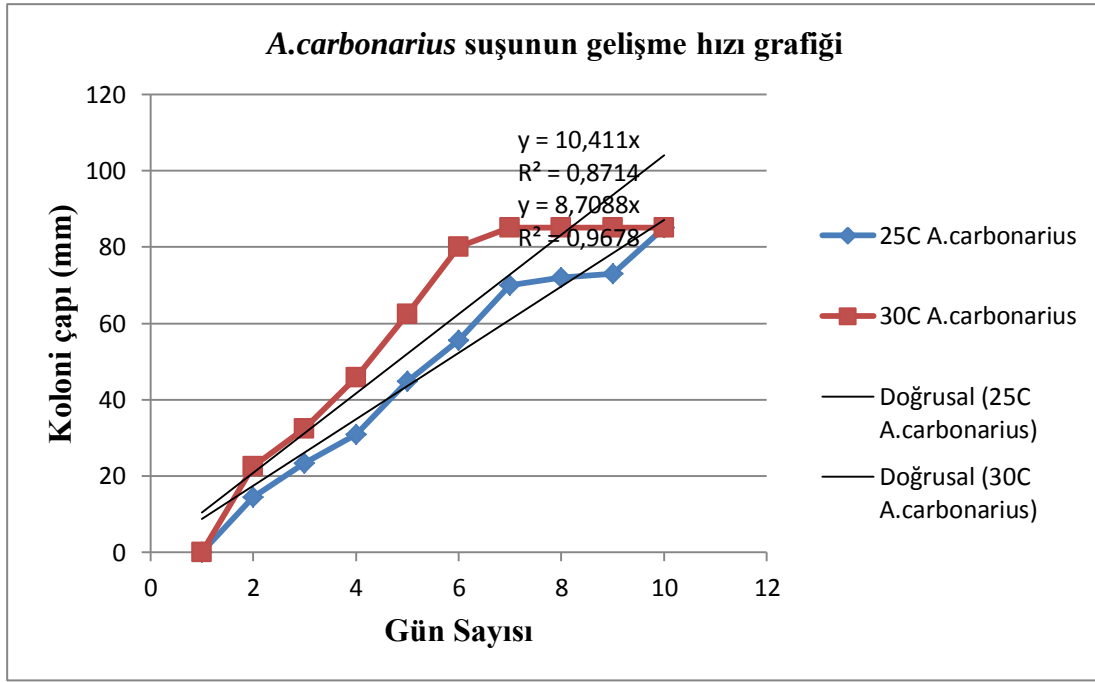
A.niger suşunun 25°C ve 30°C'lik iki farklı sıcaklık değerindeki gelişim hızlarına ait grafik Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 : *A.niger* suşunun 25°C ve 30°C'lik iki farklı sıcaklık değerindeki gelişimi.

Şekil 4.7'de görülebileceği gibi *A.niger* suşunun 25°C'deki gelişme hızı, 8.5595 mm/gün olarak; 30°C'deki gelişme hızı, 10.067 mm/gün olarak hesaplanmıştır.

A.carbonarius suşunun 25°C ve 30°C'lik iki farklı sıcaklık değerindeki gelişim hızlarına ait grafik Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8: *A.carbonarius* suşunun 25°C ve 30°C’lik iki farklı sıcaklık değerindeki gelişimi.

Şekil 4.8’de görülebileceği gibi, *A.carbonarius* suşunun 25°C’deki gelişme hızı, 8.7088 mm/gün olarak; 30°C’deki gelişme hızı, 10.411 mm/gün olarak hesaplanmıştır.

Hesaplanan sonuçlara göre; her iki suşun da 30°C’deki gelişme hızlarının, 25°C’deki gelişme hızlarına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca her iki sıcaklık değeri için de geçerli olmak üzere, *A.carbonarius* suşunun gelişme hızının, *A.niger* suşunun gelişme hızından daha yüksek olduğu yorumu yapılabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gıda maddelerinin güvenliğini ve kalitesini tehdit eden önemli başlıklardan birisi, küflerin olumsuz koşullara maruz kaldıklarında ürettikleri sekonder metabolitlerden olan mikotoksinlerdir. Çok sayıda mikotoksin çeşidi bulunmasına rağmen, her mikotoksinle aynı oranda karşılaşmamaktadır. En sık karşılaşılan ve insan sağlığı açısından en toksik olan mikotoksinlerden birisi OTA'dır. OTA, birçok küf türü tarafından, çeşitli gıda maddelerinde üretilmekle birlikte; gıda maddesinin cinsi ve çevresel faktörler başta olmak üzere pekçok parametreye bağlı olarak belli gıda maddelerinde belli türler OTA üretme konusunda ön plana çıkmaktadır.

Üzüm ve üzüm ürünlerinde en yaygın OTA üreten küf türleri *A.carbonarius*, *A.niger* ve *A.tubigenensis*'tir (Tosun ve diğ., 2006).

Bu tez çalışması kapsamında; çekirdeksiz sarı İzmir kuru üzümü ve çekirdekli siyah Adıyaman kuru üzümünden izole edilen iki farklı *Aspergillus* suşunun OTA oluşturma profilleri, suşların gelişimi sırasında substratta meydana gelen pH değişimi ve bu iki suşun iki farklı sıcaklık değerindeki (25°C ve 30°C) gelişme hızları araştırılmıştır. Çalışmada iki farklı kuru üzüm cinsinden besiortamları oluşturulduktan sonra, bu üzümlerden iki farklı *Aspergillus* suşu (*A.carbonarius* ve *A.niger*) izole edilmiştir. İzole edilen *A.carbonarius* ve *A.niger* suşlarının 10 günlük inkubasyon periyodu boyunca gelişmeleri, OTA oluşturma profilleri ve MEA besiortamında, sarı kuru üzüm kullanılarak elde edilen besiortamında, siyah kuru üzüm kullanılarak elde edilen besiortamında substratın pH değerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; *A.niger* suşunun kuru üzüm örneklerinde OTA oluşturmadığı/oluşan miktarın besiortamında tespit edilemeyecek kadar düşük olduğu belirlenmiştir. *A.carbonarius* suşunun ise 0 ng/mL–2.219 ng/mL aralığındaki miktarlarda OTA oluşturduğu bulunmuştur.

A.niger suşunun 25°C'deki gelişme hızı, 8.5595 mm/gün olarak; 30°C'deki gelişme hızı, 10.067 mm/gün olarak hesaplanmıştır. *A.carbonarius* suşunun 25°C'deki gelişme hızı, 8.7088 mm/gün olarak; 30°C'deki gelişme hızı, 10.411 mm/gün olarak

hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre 30°C'deki gelişme hızının 25°C'ye oranla daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde yapılan bir çalışma sonucuna göre; 30°C'deki gelişme hızının (koloni çapı: 90 mm) daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Passamani ve diğ., 2014). Bu çalışmanın sonucu, literatür ile uyum göstermektedir.

10 günlük inkubasyon periyodu boyunca gelişen suşların küf kolonilerinin altındaki besiyortamlarından hergün düzenli örnek alınarak yapılan pH ölçümlerine ait değerler; MEA besiyerinde *A.niger* suşu için 5.13–2.38 ve *A.carbonarius* suşu için 5.13–2.18; sarı üzüm kullanılarak elde edilen besiyortamında *A.niger* suşu için 3.89–1.86 ve *A.carbonarius* suşu için 3.89–1.84 aralığında ve siyah üzüm kullanılarak elde edilen besiyortamında *A.niger* suşu için 4.07–2.11 ve *A.carbonarius* suşu için 4.07–1.83 aralığındadır.

Bu çalışmanın özgün olan özelliği; suşların OTA analizinde küf kolonilerini örneğe dahil etmeden sadece koloninin altında kalan bir başka ifadeyle substratın örnek olarak alınıp; küfün substratta meydana getirdiği değişimin gözlenmesini sağlamasıdır.

Bu tez çalışmasında; gerek geleneksel olarak yaygın şekilde tüketilen, gerekse de önemli bir ihracat ürünü olması açısından ekonomik değeri yüksek olan kuru üzümde *A.carbonarius* suşunun OTA açısından risk oluşturduğu; küfün kendisi üründen uzaklaştırılsa bile toksinin üründe kalabileceği belirlenmiştir.

İnsan sağlığı açısından riskli bir mikotoksin olan OTA riskinin minimum indirilebilmesi için tüketicilere düşen görev güvenilir markaların uygun koşullarda üretip satışa sunduğu ürünleri tercih etmek olup; üreticilere düşen görev ise gıda güvenliğini sağlayarak ürünün üretilmesinden tüketiciye ulaşmaya kadar olan süreci bilinçli ve disiplinli bir şekilde yönetmektir. Bu yaklaşımların yaygınlaşmasıyla ürün kalitesi ve güvenliği konularında olumlu gelişmelerin yaşanması kolaylaşır.

KAYNAKLAR

- Amezqueta, S. Gonzalez-Penas, E. Arbizu, M.M. & Cerain, A.L.** (2009). Ochratoxin A decontamination: A review, *Food Control*, 20(4), 326–333.
- Amrita Vishwa Vidyapeetham University.** (2016). Bacterial growth curve. Erişim: 20 Mart 2016, <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=73&sim=1105&cnt=1>
- Arda, M.** (2000). Bakterilerin üremelerine etkili faktörler. Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinici Baskı
- Astoreca, A. Magnoli, C. Barberis, C. Chiacchiera, S.M. Combina, M. & Dalcero, A.** (2007). Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus section Nigri* strains isolated from different substrates in Argentina, *Science of the Total Environment*, 388(1–3), 16–23.
- Ayhan, K.** (2000). Gıdalarda mikroorganizma gelişmesini etkileyen faktörler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2000. Genişletilmiş 2. Baskı
- Batista, L. R. Chalfoun, S. M. Prado, G. Schwan, R. F. & Wheals, A. E.** (2003). Toxigenic fungi associated with processed green coffee beans (*Coffea arabica* L.), *International Journal of Food Microbiology*, 85, 293–300. Alınmıştır Batista, L.R. Chalfoun, S.M. Silva, C.F. Cirillo, M. Varga, E.A. & Schwan, R.F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods, *Food Control* 20(9), 784–790.
- Battilani, P. & Pietri, A.** (2002). Ochratoxin A in grapes and wine, *European Journal of Plant Pathology*, 108(7), 639–643.
- Battilani, P. Barbano, C & Logrieco, A.** (2008). Risk assessment and safety evulation of mycotoxins in fruits. In R.B. Golan & N. Paster (Eds.), *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* (Vol., 1, pp.1–27). UK: Elsevier.
- Battilani, P. Giorni, P. Bertuzzi, T. Formenti, S. & Pietri, A.** (2006). Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy, *International Journal of Food Microbiology*, 111(Suppl 1), 53–60.
- Battilani, P. Magan, N. & Logrieco, A.** (2006). European research on ochratoxin A in grapes and wine, *International Journal of Food Microbiology*, 111(1), S2–S4.
- Battilani, P. Pietri, A. Bertuzzi, T. Languasco, L. Giorni, P. & Kozakiewicz, Z.** (2003). Occurence of ochratoxin A–producing fungi in grapes grown in Italy, *Journal of Food Protection*, 66(4), 633–636.
- Belli, N. Ramos, A.J. Coronas, I. Sanchis, V. & Marin, S.** (2005). *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape

medium in relation to environmental factors, *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 839–844.

- Belli, N. Ramos, A.J. Sanchis, V. & Marin, S.** (2004). Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus section Nigri* strains isolated from grapes, *Letters in Applied Microbiology*, 38(1), 72–77.
- Berente, B. Moricz, A. H-Otta, K. Zaray, G. Leko, L. & Racz, L.** (2005). Determination of ochratoxin A in Hungarian wines, *Microchemical Journal*, 79 (1–2), 103–107.
- Brera, C. Santis, B.D. Debegnach, F. & Miraglia, M.** (2008). Mycotoxins, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 51(8): 363–427.
- Cabanas, R. Bragulat, M.L. Abarca, M.L. Castella, G. & Cabanes, F.J.** (2008). Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market, *Food Microbiology*, 25(5), 642–647.
- Codex Alimentarius** (2013). General standard for contaminants and toxins. Erişim: 25 Şubat 2016, http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?no_cache=1
- Çağlarırnak, N.** (2006). Ochratoxin A, hydroxymethylfurfural and vitamin C levels of sun-dried grapes and sultanas, *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(5), 549–562.
- Duarte, S.C. Pena, A. & Lino, C.M.** (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products, *Food Microbiology*, 27(2), 187–198.
- Duran, M.** (2003). Üzüm Etüdü. Dış Ticaret Araştırma Servisi
- Erginkaya, Z. & Kabak, B.** (2011). Fırsatçı Patojenler, Küfler, Parazitler, Virüsler, Prionlar ve Alg Toksinleri. In O.Erkmen (Ed.), *Gıda Mikrobiyolojisi* (Vol., 3, ss.184–202). Ankara: Efil Yayınevi.
- Esteban, A. Abarca, M.L. Bragulat, M.R. & Cabanes, F.J.** (2006). Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*, *Food Microbiology*, 23(7), 634–640.
- European Commission** (2010). Maximum levels for certain contaminants. Erişim: 25 Şubat 2016, http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/l21290_en.htm
- FDA** (2001). Factors that influence microbial growth. In Safe Practices for Food Processes
- FDA** (2015). Water activity (aw) in foods. Erişim: 26 Mart 2016, <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/InspectionTechnicalGuides/ucm072916.htm>
- Frisvad, J.C. Frank, J.M. Houburken, J.A.M.P. Kuijpers, A.F.A. & Samson, R.A.** (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*, *Studies In Mycology*, 50, 23–43.

- Frisvad, J.C. Thrane, U. Samson, R.A. & Pitt, J.I.** (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. In A.D. Hocking, J.I. Pitt, R.A. Samson & U. Thrane (Eds.), *Advances in Food Mycology* (Vol., 571, pp.3–31). USA: Springer.
- Golan, R.B.** (2008a). *Aspergillus* mycotoxins. In: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, Elsevier Inc. pp. 115–151.
- Golan, R.B.** (2008b). *Penicillium* mycotoxins. In: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, Elsevier Inc. pp. 153–183.
- Hacettepe Üniversitesi.** (t.y.). *Kromatografi* [PowerPoint slides]. Retrieved from <http://www.analitik.hacettepe.edu.tr/Demolar/kromatografi.pdf>
- Heperkan, D.** (2011). Gıdalarda Mikroorganizmaların Çoğalması ve Çoğalmayı Etkileyen Faktörler. In O. Erkmén (Ed.), *Gıda Mikrobiyolojisi* (Vol., 3, ss.184–202). Ankara: Efil Yayınevi.
- Hocking, A.D. Leong, S.L. Kazi, B.A. Emmett, R.W. & Scott, E.S.** (2007). Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products, *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1–2), 84–88.
- Hussein, H.S. & Brasel, J.M.** (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology*, 167 (2), 101–134.
- Iamanaka, B.T. Taniwaki, M.H. Menezes, H.J. Vicente, E. & Fungaro, M.H.P.** (2005). Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil, *Food Additives and Contaminants*, 22(12), 1258–1263.
- Joint Genome Institute (JGI), MycoCosm The Fungal Genomics Resource** (2016). *Aspergillus carbonarius* ITEM 5010 v3. Erişim: 03 Mart 2016, <http://genome.jgi.doe.gov/Aspca3/Aspca3.home.html>
- Kabak, B.** (2009). Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: Occurrence and exposure assessment, *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), 348–352.
- Kenyon College.** (2010a). *Aspergillus* description and significance. Erişim: 27 Şubat 2016, <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus>
- Kenyon College.** (2010b). *Aspergillus niger* description and significance. Erişim: 27 Şubat 2016, https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus_niger
- KGM** (2014). Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü 2014 Yılı Çekirdeksiz Kuru Üzüm Raporu.
- Kılınç, E. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı.** (2010). *Kromatografik sistemlerde elektrokimyasal uygulamalar* [PowerPoint slides].
- Larsen, D.** n.d. Raoult's law. Erişim: 27 Mart 2016, http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/Solutions_and_Mixtures/Ideal_Solutions/Changes_In_Vapor_Pressure,_Raoult's_Law
- Larsen, T. O. Svendsen, A. & Smedsgaard, J.** (2001). Biochemical of ocratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3630–3635. Alınmıştır Batista,

- L.R. Chalfoun, S.M. Silva, C.F. Cirillo, M. Varga, E.A. & Schwan, R.F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods, *Food Control*, 20(9), 784–790.
- Magnoli, C. Astoreca, A. Ponsone, L. Combina, M. Palacio, G. Rosa, C.A.R. & Dalcero, A.M.** (2004). Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets, *Letters in Applied Microbiology*, 39(4), 326–331.
- Magnoli, C. Astoreca, A. Ponsone, L. Fernandez-Juri, M.G. Chiacchiera, S.M. & Dalcero, A.** (2006b). Ochratoxin A and the occurrence of ochratoxin A-producing black aspergilli in stored peanut seeds from Cordoba, Argentina, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2369–2373.
- Magnoli, C. Hallak, C. Astoreca, A. Ponsone, L. Chiacchiera, S. & Dalcero, A.M.** (2006a). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina, *Mycopathologia*, 161(1), 53–58.
- Magnoli, C. Violante, M. Combina, M. Palacio, G. & Dalcero, A.** (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina, *Letters in Applied Microbiology*, 37(2), 179–184.
- Mateo, F. Gadea, R. Medina, A. Mateo, R. & Jiménez, M.** (2009). Predictive assessment of ochratoxin A accumulation in grape juice based-medium by *Aspergillus carbonarius* using neural networks, *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 915–927.
- Medina, A. Mateo, R. Lopez-Ocana, L. Valle-Algarra, F.M. & Jimenez, M.** (2005). Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4696–4702.
- Meyvacı, K.B. Altındış, A. Aksoy, U. Eltem, R. Turgut, H. Arasiler, Z. & Kartal, N.** (2005). Ochratoxin A in sultanas from Turkey I: Survey of unprocessed sultanas from vineyards and packing-houses, *Food Additives and Contaminants*, 22(11), 1138–1143.
- Murphy, P.A. Hendrich, S. Landgren, C. & Bryant, C.M.** (2006). Food mycotoxins: An update, *Journal of Food Science*, 71(5), 51–65.
- Nielsen, K.F. Mogensen, J.M. Johansen, M. Larsen, T.O. & Frisvad, J.C.** (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5): 1225–1242.
- Passamani, F.B.F. Hernandez, T. Lopes, N.A. Bastos, S.C. Santiago, W.D. Cardoso, M.G. & Batista, L.R.** (2014). Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes, *Journal of Food Protection*, 77(11), 1947–1952.

- Pazlarova, J.** n.d. *Factors affecting microbial growth in food* [PowerPoint slides]. Retrieved from http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ifm/Microbial_growth_in_food.pdf
- Pitt, J. I.** (2000). Toxigenic fungi: Which are important?, *Medical Mycology Supplement*, 38(1), 17–22. Alınmıştır Batista, L.R. Chalfoun, S.M. Silva, C.F. Cirillo, M. Varga, E.A. & Schwan, R.F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods, *Food Control* 20(9), 784–790.
- RASFF** (2013). RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed. 2013 Annual Report. Erişim: 22 Mart 2016, http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2013.pdf
- RASFF** (2014). RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed. 2014 Annual Report. Erişim: 22 Mart 2016, http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2014.pdf
- RASFF** (2015). RASFF–Rapid Alert System for Food and Feed. 2015 Preliminary Annual Report. Erişim: 22 Mart 2016, http://ec.europa.eu/food/safety/docs/rasff_annual_report_2015_preliminary.pdf
- RASFF** (2016). RASFF–Food and feed safety alerts. Erişim: 01 Nisan 2016, http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm
- Ratti, C.** (2009). Dehydration Principles. In C.Ratti (Ed.), *Advances in Food Dehydration* (pp. 21–22). New York: CRC Press Taylor & Francis Group
- Reddy, L. & Bhoola, K.** (2010). Ochratoxins—food contaminants: impact on human health, *Toxins*, 2(4), 771–779.
- Richard, J.L.** (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview, *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1–2), 3–10.
- Ringot, D. Chango, A. Schneider, Y.J. & Larondelle, Y.** (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update, *Chemico-Biological Interactions*, 159(1), 18–46.
- Romero, S.M. Comerio, R.M. Larumbe, G. Ritieni, A. Vaamonde, G. & Pinto, V.F.** (2005). Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina, *International Journal of Food Microbiology*, 104(1), 43–49.
- Samson, R.A. Houbraken, J.A.M.P. Kuijpers, A.F.A. Frank, J.M. & Frisvad, J.C.** (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*, *Studies In Mycology*, 50, 45–61.
- Skoog, D.A. West, D.M. ve Holler, F.J.** (1999). *Analitik kimya temelleri 2.cilt* (E. Kılıç ve F. Köseoğlu, Çev.). Ankara: Bilim Kitap Kirtasiye.
- Stefanaki, I. Foufa, E. Tsatsou-Dritsa, A. & Dais, P.** (2003). Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits, *Food Additives and Contaminants*, 20(1), 74–83.

- Suanthie, Y. Cousin, M.A. & Woloshuk, C.P.** (2009). Multiplex real – time PCR for detection and qualification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, *Journal of Stored Products Research* 45(2), 139–145.
- Sulyok, M. Krska, R. & Schuhmacher, R.** (2010). Application of an LC–MS/MS based multi–mycotoxin method for the semi–quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds, *Food Chemistry*, 119(1), 408–416.
- TGK** (2011). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. Gıdalardaki bulaşanların maksimum limitleri. Erişim: 25 Şubat 2016, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8-1.pdf>
- Tjamos, S.E. Antoniou, P.P. Kazantzidou, A. Antonopoulos, D.F. Papageorgiou, I. & Tjamos, E.C.** (2004). *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece: population composition, ochratoxin A production and chemical control, *Journal of Phytopathology*, 152(4), 250–255.
- Tosun, H. Demirel, N.N. & Çoban, H.** (2006). Üzüm ve üzüm ürünlerinde okratoksin A sorunu, *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 2.2, 141–145.
- TSE** (2002). Türk Standartları Enstitüsü Çekirdeksiz Kuru Üzüm Standardı. Erişim: 05 Mart 2016, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/06/20050603-10-1.doc>
- Tunail, N.** (2000). Funguslar ve mikotoksinler. In: Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. baskı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. ss. 1–50.
- Turner, N.W. Subrahmanyam, S. & Piletsky, S.A.** (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review, *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 168– 180.
- Valero, A. Marin, S. Ramos, A.J. & Sanchis, V.** (2005). Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors, *Letters in Applied Microbiology*, 41(2), 196–201.
- Van der Merwe, K.J. Steyn, P.S. & Fourie, L.** (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh, *Nature*, 205, 1112–1113.
- Yang, W. Sokhansanj, S. Cenkowski, S. Tang, J. & Wu, Y.** (1997). A general model for sorption hysteresis in food materials, *Journal of Food Engineering*, 33(3–4), 421–444.
- Zhang, A. Ma, Y. Feng, L. Wang, Y. He, C. Wang, X. & Zhang, H.** (2011). Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China, *Food Control*, 22(11), 1723–1728.
- Zinedine, A. Soriano, J.M. Juan, C. Mojemmi, B. Moltó, J.C. Bouklouze, A. Cherrah, Y. Idrissi, L. Aouad, R.E. & Mañes, J.** (2007). Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Sale’area, Morocco, *Food Additives and Contaminants*, 24(3), 285–291.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ece GÖKMEN
Doğum Tarihi ve Yeri : 19.03.1991 İstanbul
E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2014, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya–Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

AKADEMİK DENEYİMLER:

- Poster Presentation:” Encapsulation methods of probiotic lactic acid bacteria” in PBS-2015 Probiotics Summit, United Scientific Group, July 06-08, 2015, San Francisco, USA.
- Oral Presentation:” Prevention of aflatoxin and ochratoxin A production by the application of HACCP approach” in Joint International Congress 14th Congress of Mediterranean Phytopathological Union & International Society of Mycotoxicology (Mediterranean Branch), August 25-29, 2014, Istanbul, TURKEY.