

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİN VE ZEYTİNYAĞINDA MİKOTOKSİN VARLIĞI, SİYAH
ZEYTİNDE *A. CARBONARIUS* VE *P. VERRUCOSUM* TARAFINDAN
OKRATOKSİN A OLUŞTURULMASINA SICAKLIĞIN ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ
Gülçin DAZKIR**

Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği

Programı : Gıda Mühendisliği

NİSAN 2010

**ZEYTİN VE ZEYTİNYAĞINDA MİKOTOKSİN VARLIĞI, SİYAH
ZEYTİNDE *A. CARBONARIUS* VE *P. VERRUCOSUM* TARAFINDAN
OKRATOKSİN A OLUŞTURULMASINA SICAKLIĞIN ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ
Gülçin DAZKIR
(506032504)**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22 Aralık 2009

Tezin Savunulduğu Tarih : 07 Nisan 2010

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Dilek HEPERKAN (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Gülden OMURTAG (MÜ)
Prof. Dr. Kamil BOSTAN (İÜ)
Doç. Dr. Beraat ÖZÇELİK (İTÜ)
Yrd. Doç. Dr. Filiz ALTAY (İTÜ)**

NİSAN 2010

Eşime, oğluma ve aileme,

ÖNSÖZ

Doktora danışmanlığımı üstlenen ve bana her konuda destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Dilek HEPERKAN'a, çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER ve Levent DİNÇER'e, tez çalışmama maddi destek sağlayan İTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, deneysel analizlerimde her türlü desteği sağlayan İBB Sağlık ve Hıfzıssıhha Müdür Yardımcısı M.V. Zeki AŞKIN, Kimya Laboratuvar Şefi Reyhan ORUÇ ve Mikrobiyoloji Laboratuvar Şefi Gülay YILMAZ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında her zaman yanımda olan, büyük bir fedakarlık ve sabır gösteren sevgili eşim Mehmet DAZKIR'a, tüm eğitim hayatım boyunca beni maddi, manevi her konuda destekleyen ve biricik oğlum Ege'nin bakımını üstlenen annem Ferahnur ŞİŞMANOĞLU'na ve babam Mehmet ŞİŞMANOĞLU'na, kayınvalidem Günay DAZKIR'a ve her konuda yardımını esirgemeyen kardeşim Elçin ŞİŞMANOĞLU'na ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Nisan 2010

Gülçin DAZKIR
(Gıda Y. Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Zeytin	3
2.1.1 Zeytinin tanımı	3
2.1.1.1 Zeytinin tarihçesi	3
2.1.1.2 Zeytinin biyolojisi	3
2.1.1.3 Zeytin üretimine ayrılan alan	4
2.1.1.4 Zeytinin sınıflandırılması	5
2.1.1.5 Zeytinin besinsel bileşimi	6
2.1.2 Sofralık zeytin üretimi ve ticareti.....	7
2.1.2.1 Dünyada ve Türkiye’de sofralık zeytin üretimi	7
2.1.2.2 Sofralık zeytin ihracatı	9
2.1.2.3 Sofralık zeytin ithalatı	9
2.1.2.4 Sofralık zeytin tüketimi	10
2.1.3 Sofralık zeytin üretim yöntemleri	11
2.1.3.1 İspanyol tipi yeşil zeytin üretimi	11
2.1.3.2 Kaliforniya tipi siyah zeytin üretimi	12
2.1.3.3 Grek tipi natürel siyah zeytin üretimi	13
2.1.3.4 Türk tipi salamura natürel siyah zeytin üretimi	13
2.1.4 Zeytin fermentasyonu.....	15
2.1.4.1 Yeşil zeytin fermentasyonu	16
2.1.4.2 Konserve zeytin fermentasyonu	17
2.1.4.3 Natürel siyah zeytin fermentasyonu	18
2.1.5 Zeytinde bozulma	19
2.2 Zeytinyağı.....	21
2.2.1 Zeytinyağının tanımı	21
2.2.2 Zeytinyağı üretimi ve ticareti	22
2.2.2.1 Dünyada ve Türkiye’de zeytinyağı üretimi	22
2.2.2.2 Zeytinyağı ihracatı	23
2.2.2.3 Zeytinyağı ithalatı	23
2.2.2.4 Zeytinyağı tüketimi	24
2.2.3 Zeytinyağı üretimi	24
2.2.3.1 Yağ ekstraksiyonu	25

2.2.3.2 Yağın bileşimi	26
2.2.3.3 Yağın kalitesi	28
2.3 Küf Gelişimi ve Mikotoksin Oluşumu	29
2.3.1 Mikotoksin oluşumunda etkili faktörler	32
2.3.2 Mikotoksinler ile ilgili yasal limitler	33
2.3.3 Zeytinde küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu	35
2.3.4 Zeytinyağında mikroflora	38
2.4 Aflatoksinler	38
2.4.1 Aflatoksin bulunan gıdalar	40
2.4.2 Aflatoksin'in toksisitesi	40
2.5 Okratoksin A (OTA)	41
2.5.1 OTA üreten küfler	42
2.5.2 OTA'nın bulunduğu gıdalar	43
2.5.3 Diyet ile OTA alımı	44
2.5.4 OTA'nın toksisitesi	45
2.6 <i>Aspergillus carbonarius</i> 'un Özellikleri	47
2.6.1 <i>A. carbonarius</i> 'un bulunduğu gıdalar	48
2.6.2 <i>A. carbonarius</i> ile ilgili çalışmalar	48
2.7 <i>Penicillium verrucosum</i> 'un Özellikleri	52
2.7.1 <i>P. verrucosum</i> 'un bulunduğu gıdalar	53
2.7.2 <i>P. verrucosum</i> ile ilgili çalışmalar	54
2.8 Aflatoksin ve OTA Detoksifikasyonu İle İlgili Çalışmalar	56
3. MATERYAL VE METOT	59
3.1 Materyal	59
3.1.1 Zeytin ve zeytinyağı örnekleri	59
3.1.2 Küf suşları	59
3.1.3 Sarf malzemeleri	60
3.1.3.1 Kimyasal sarflar	60
3.1.3.2 Besiyerleri	60
3.1.4 Alet-ekipman	61
3.2 Metot	62
3.2.1 Kimyasal analizler	62
3.2.1.1 Nem tayini	62
3.2.1.2 Yağ tayini	62
3.2.1.3 Protein tayini	62
3.2.1.4 Kül tayini	62
3.2.1.5 pH tayini	62
3.2.1.6 Tuz tayini	62
3.2.1.7 Asitlik tayini	63
3.2.1.8 Yağ asidi kompozisyonu tayini	63
3.2.2 Spor süspansiyonunun hazırlanması	64
3.2.3 Zeytin ezmesi örneklerinin aşılınması	64
3.2.4 Su aktivitesi tayini	64
3.2.5 HPLC koşulları	64
3.2.6 Kalibrasyon eğrisi	65
3.2.6.1 Aflatoksin B ₁ kalibrasyon eğrisi	65
3.2.6.2 OTA kalibrasyon eğrisi	66
3.2.7 Mikotoksin analizleri	67
3.2.7.1 Aflatoksin analizi	67
3.2.7.2 OTA analizi	68

3.2.7.3 Geri kazanımın hesaplanması ve tayin limiti	68
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	71
4.1 Aflatoksin ve OTA Tarama Çalışması	71
4.1.1 Sofralık siyah zeytinde aflatoksin ve OTA	71
4.1.2 Zeytinyağında aflatoksin ve OTA	73
4.2 Kimyasal Analizler	75
4.3 Sofralık Siyah Zeytinde Aşılama Çalışması	76
4.3.1 <i>A. carbonarius</i> tarafından farklı sıcaklıklarda OTA oluşumu	76
4.3.2 <i>P. verrucosum</i> tarafından farklı sıcaklıklarda OTA oluşumu	80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	85
EKLER	99
ÖZGEÇMİŞ	103

KISALTMALAR

OTA	: Okratoksin A
AFB₁	: Aflatoksin B ₁
AFB₂	: Aflatoksin B ₂
AFG₁	: Aflatoksin G ₁
AFG₂	: Aflatoksin G ₂
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
JECFA	: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
TDI	: Tolere Edilebilir Günlük Alım Miktarı
TWI	: Tolere Edilebilir Haftalık Alım Miktarı
PDA	: Patates Dekstroz Agar
SGM	: Sentetik Üzüm Suyu Besiyeri
MEA	: Malt Ekstrakt Agar
SNM	: Sentetik Nutrient Besiyeri
NaMBS	: Sodyum metabisülfid
CYA	: Czapek Yeast Ekstrakt Agar
YES	: Yeast Ekstrakt Sukroz
BMEA	: Barley Meal Ekstrakt Agar
DRYES	: Dikloran Rose Bengal Yeast Ekstrakt Sukroz Agar
DYSG	: Dikloran Yeast Ekstrakt Sukroz Agar
DG18	: Dikloran %18 Gliserol Agar
ATP	: Adenozin Trifosfat
PKSs	: Poliketid Sentezi
CBS	: Kültür Koleksiyonu Merkezi
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
PBS	: Fosfat Buffered Saline

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : 2000-2008 yılları arasında zeytin üretimine ayrılan alan ve verimlilik.	4
Çizelge 2.2 : Zeytinin bileşimi	6
Çizelge 2.3 : Dünya sofralık zeytin üretimi (1000 ton).	8
Çizelge 2.4 : Dünya sofralık zeytin ihracatı (1000 ton).	9
Çizelge 2.5 : Dünya sofralık zeytin ithalatı (1000 ton).	10
Çizelge 2.6 : Dünya zeytin tüketimi (1000 ton)	10
Çizelge 2.7 : Dünya zeytinyağı üretimi (1000 ton).	22
Çizelge 2.8 : Dünya zeytinyağı ihracatı (1000 ton).	23
Çizelge 2.9 : Dünya zeytinyağı ithalatı (1000 ton)	23
Çizelge 2.10 : Dünya zeytinyağı tüketimi (1000 ton).	24
Çizelge 2.11 : Maksimum aflatoksin limitleri.	34
Çizelge 2.12 : Maksimum okratoksin A (OTA) limitleri.	35
Çizelge 3.1 : Malt ekstrakt agar bileşimi.	60
Çizelge 3.2 : Sabouraud dekstroz agar bileşimi.	61
Çizelge 3.3 : Peptonlu su bileşimi.	61
Çizelge 3.4 : Aflatoksin B ₁ (AFB ₁) çalışma standardının hazırlanması.	65
Çizelge 3.5 : Okratoksin A (OTA) çalışma standardının hazırlanması.	66
Çizelge 4.1 : Sofralık siyah zeytin örneklerinde AFB ₁ ve OTA varlığı.	71
Çizelge 4.2 : Sofralık siyah zeytin örneklerinin OTA miktarı (µg/kg).	72
Çizelge 4.3 : Zeytinyağı örneklerinde AFB ₁ ve OTA varlığı.	73
Çizelge 4.4 : Zeytinyağı örneklerinde OTA miktarı (µg/kg).	74
Çizelge 4.5 : Sofralık siyah zeytinin bileşimi.	75
Çizelge 4.6 : Sofralık siyah zeytin örneklerinin yağ asidi kompozisyonu.	76
Çizelge 4.7 : Sofralık siyah zeytinde <i>A. carbonarius</i> tarafından OTA oluşumu.	77
Çizelge 4.8 : Sofralık siyah zeytinde <i>P. verrucosum</i> tarafından OTA oluşumu.	80
Çizelge A.1 : Farklı sıcaklık dereceleri için varyans analizi (<i>P. verrucosum</i>).	100
Çizelge A.2 : Duncan'ın çoklu aralık testi (<i>P. verrucosum</i>).	100
Çizelge A.3 : Farklı sıcaklık dereceleri için varyans analizi (<i>A. carbonarius</i>).	100
Çizelge A.4 : Duncan'ın çoklu aralık testi (<i>A. carbonarius</i>).	100

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Zeytin ağacının görünümü.....	5
Şekil 2.2 : Zeytin meyvesinin görünümü.....	5
Şekil 2.3 : Türk tipi natürel siyah zeytin üretimi akış şeması.....	13
Şekil 2.4 : Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ ve G ₂ ’ nin kimyasal yapısı.....	39
Şekil 2.5 : OTA’nın kimyasal yapısı	41
Şekil 2.6 : Diyet ile OTA alım oranı.....	45
Şekil 2.7 : <i>Aspergillus carbonarius</i> ’un PDA’da görünümü	48
Şekil 2.8 : <i>Penicillium verrucosum</i> ’un MEA ve CYA besiyerinde görünümü	52
Şekil 2.9 : <i>Penicillium verrucosum</i> küf kolonisi üzerindeki glutation damlacığı.....	55
Şekil 3.1 : AFB ₁ kalibrasyon eğrisi	66
Şekil 3.2 : OTA kalibrasyon eğrisi	67
Şekil 3.3 : Kontrol (blank) zeytin örneği HPLC kromatogramı	69
Şekil 4.1 : Sofralık siyah zeytinde <i>A. carbonarius</i> tarafından farklı sıcaklıklarda OTA oluşumu.....	78
Şekil 4.2 : Sofralık siyah zeytinde <i>P. verrucosum</i> tarafından farklı sıcaklıklarda OTA oluşumu.....	81
Şekil A.1 : OTA standart kromatogramları	101
Şekil A.2 : Aflatoksin mix (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) standart kromatogramları	102

ZEYTİN VE ZEYTİNYAĞINDA MİKOTOKSİN VARLIĞI, SİYAH ZEYTİNDE *A. CARBONARIUS* VE *P. VERRUCOSUM* TARAFINDAN OKRATOKSİN A OLUŞTURULMASINA SICAKLIĞIN ETKİSİ

ÖZET

Zeytin, Türkiye ve dünyada çeşitli şekillerde tüketilen önemli tarımsal ürünlerden biridir. Zengin besinsel bileşimi nedeniyle sağlıklı beslenmede büyük öneme sahiptir. Özellikle üretici ülkelerin ekonomisinde önemli rolü bulunmaktadır. İspanya, İtalya, Mısır, Yunanistan ve Türkiye bu pazardaki en önemli zeytin üreticisi ülkelerdir.

Türkiye, dünya zeytin üretiminde ilk sıralarda yer alırken, ihracatta aynı başarıyı gösterememektedir. Bu durumun en önemli nedeni, küçük ölçekteki zeytin işletmelerimizde standart kalitede üretimin gerçekleştirilememesidir. Teknolojik yeniliklerin takip edilmemesi ve zeytindeki tuz miktarının fazla olması nedeniyle diğer ülkelerin tüketim tercihlerine uygun kalitede üretimin gerçekleştirilmemesi diğer etkenlerdir.

Üretim hataları nedeniyle salamura yüzeyinde küf tabakası oluşmaktadır. Toksikjenik küfler, mikotoksin adı verilen sekonder metabolitleri üretebilmektedir. Mikotoksinler; insan ve hayvan sağlığı üzerine karsinojenik, teratojenik, mutajenik, nefrotoksik ve hepatotoksik etkidir.

Bu çalışmanın amacı, sofralık siyah zeytin ve sızma zeytin yağı örneklerinde aflatoksin ve okratoksin A (OTA) kontaminasyonunun incelenmesidir. Okratoksin A'nın hem zeytin hem de zeytinyağında yaygın bir şekilde bulunduğunun belirlenmesi üzerine okratoksin A oluşturan 2 farklı küfün (*Aspergillus carbonarius* ve *Penicillium verrucosum*) siyah zeytinde OTA oluşumundaki rolleri de incelenmiştir.

Çalışmamızda, İstanbul ve çevresindeki halk pazarlarından temin edilen otuz sofralık siyah zeytin ve otuz zeytinyağı örneğinde aflatoksin ve OTA varlığı incelenmiştir. Yalnızca bir adet siyah zeytin ve bir adet zeytinyağı örneğinde 0,03 µg/kg aflatoksin B₁ (AFB₁) kontaminasyonu belirlenmiştir. Sofralık siyah zeytinin aflatoksin oluşumu açısından zayıf bir substrat olduğu görüşü çalışmamız ile de desteklenmiştir. Buna karşılık, sofralık siyah zeytin örneklerinin %73,3 ünün 0,54-2,99 µg/kg düzeyinde ve zeytinyağı örneklerinin %83,3 ünün 0,36-2,10 µg/kg düzeyinde OTA içerdiği tespit edilmiştir. Bir zeytin ve bir zeytinyağı örneğinde AFB₁ ve OTA'nın birlikte bulunduğu gözlenmiştir. Bir zeytin örneğinde de 0,03 µg/kg aflatoksin G₁ (AFG₁) belirlenmiştir.

Zeytin ve zeytinyağı örneklerinde OTA kontaminasyonunun yaygın bir şekilde belirlenmesi üzerine *Aspergillus carbonarius* ve *Penicillium verrucosum* tarafından siyah zeytinde OTA oluşumuna sıcaklığın etkisi incelenmiştir.

A. carbonarius ve *P. verrucosum* ile aşıl原因 ezme halindeki zeytin örnekleri, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C de 21 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince belirli aralıklarla OTA analizi yapılmıştır.

A. carbonarius ile aşılanan siyah zeytin örneklerinde maksimum OTA akümülayonu (54,54 µg/kg) 15°C de inkübasyonun 3. gününde belirlenmiştir. 10°C ve 40°C de, küf gelişimi ve OTA oluşumu tespit edilmemiştir. 21 günlük inkübasyon süresince 15°C de belirlenen OTA miktarının, test edilen diğer sıcaklıklarda belirlenen miktarlardan istatistiksel olarak ($p<0,05$) önemli bir şekilde farklı olduğu belirlenmiştir. 20, 25, 30 ve 35°C de belirlenen OTA miktarları arasında ise Duncan'ın Çoklu Aralık testine göre istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığı belirlenmiştir.

P. verrucosum tarafından siyah zeytin örneklerinde 15, 20, 25, ve 30°C de oluşturulan OTA miktarları birbirine çok yakın bulunmuştur. 10°C de OTA oluşumu, test edilen diğer sıcaklıklardan (15-30°C) daha az miktardadır. 35°C de OTA akümülayonu ise sadece inkübasyonun 1. (2,10 µg/kg) ve 5. günlerinde (1,09 µg/kg) belirlenmiştir. 40°C de küf gelişimi ve OTA oluşumu belirlenmemiştir. 21 günlük inkübasyon süresince 10°C de belirlenen OTA miktarının, test edilen diğer sıcaklıklarda belirlenen miktarlardan istatistiksel olarak ($p<0,05$) önemli bir şekilde farklı olduğu belirlenmiştir. 15, 20, 25 ve 30°C de belirlenen OTA miktarları arasında ise Duncan'ın Çoklu Aralık testine göre istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığı belirlenmiştir.

Toksin standardı içeren kontrol (spiked) örneklerinde ortalama geri kazanım oranı AFB₁ için %75 ve OTA için %72'dir. AFB₁, AFG₁ ve OTA için tayin sınırı (LOD) sırasıyla 0,03 µg/kg, 0,05 µg/kg ve 0,3 µg/kg'a eşdeğer olarak tahminlenmiştir.

MYCOTOXINS IN OLIVE AND OLIVE OIL, EFFECT OF TEMPERATURE ON OCHRATOXIN A PRODUCTION BY *A. CARBONARIUS* AND *P. VERRUCOSUM* IN BLACK OLIVE

SUMMARY

Olive is one of the most important agricultural products consumed in various forms around the world and in Turkey. Olive has great importance on human nutrition due to its rich dietary composition. Olive plays an important role in the economy, especially for the producer countries. Spain, Italy, Egypt, Greece and Turkey are the most important olive producers in this market.

Although being one of the most important olive producer countries, Turkey has not succeeded in the exportation of it. The most important reason of this aspect is non-standard quality in olives because of the small scale manufactures. The other reasons are lack in following the technological innovations and unsatisfaction of consumer preferences in importing countries because of the high salt content of it.

As a result of the mistakes in the production, the mould layer formation becomes on the surface of the pickles. The toxigenic moulds can produce some seconder metabolites called mycotoxins. Mycotoxins may have carcinogenic, teratogenic, mutagenic, nephrotoxic and hepatotoxic effects on human and animal health.

The purpose of this study is to detect aflatoxin and ochratoxin A (OTA) contamination in black table olive and virgin olive oil samples. Ochratoxin A was determined to be widely spread both in olives and olive oil; therefore, ochratoxin A forming two different mold species' (*Aspergillus carbonarius* and *Penicillium verrucosum*) roles in producing OTA in black olives was also investigated.

In this study, the existence of aflatoxin and OTA in thirty black table olive and thirty virgin olive oil samples obtained from the public bazaars in and around Istanbul was investigated. It was found that only one of the black table olive and one of the olive oil samples had 0.03 µg/kg of aflatoxin B₁ (AFB₁) contamination. The results for black olive confirms literature as being a weak substrate for aflatoxin formation. On the other hand, it was determined that 73.3% of black table olive samples contained 0.54-2.99 µg/kg of OTA and 83.3% of the olive oil samples had 0.36-2.10 µg/kg of OTA. Additionally, one olive sample and one olive oil sample had aflatoxin B₁ and OTA co-occurrence. Also, one of the black table olive samples contained 0.03 µg/kg of aflatoxin G₁ (AFG₁).

OTA contamination was determined frequently in olive and olive oil samples. So, the effect of the temperature on OTA production by *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium verrucosum* in black olive was investigated.

Olive paste samples inoculated with *A. carbonarius* and *P. verrucosum* were incubated for 21 days at 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40°C. During the incubation, OTA detection was performed by certain intervals.

Maximum OTA accumulation (54.54 µg/kg) in black olive samples inoculated with *A. carbonarius* was detected at 15°C and on the 3rd day of incubation. Mould growth and OTA production were not detected at 10°C and 40°C. OTA level detected at 15°C during the 21 day incubation period, was found to be statistically ($p<0.05$) significant and different in contrast to the other tested temperatures. At 20, 25, 30 and 35°C the difference between the detected OTA levels did not show statistical significance when Duncan's Multiple Interval test is used.

OTA amounts produced by *P. verrucosum* in black olive samples at 15, 20, 25 and 30°C are similar. OTA production at 10°C was lower than the other tested temperatures (15-30°C). OTA accumulation at 35°C was detected only the 1st day (2.10 µg/kg) and 5th day (1.09 µg/kg) of the incubation. Mould growth and OTA production were not detected at 40°C. OTA level detected at 10°C during the 21 day incubation period, was found to be statistically ($p<0.05$) significant and different in contrast to the other tested temperatures. At 15, 20, 25 and 30°C the difference between the detected OTA levels did not show statistical significance when Duncan's Multiple Interval test is used.

Mean recovery rates of the spiked samples were 75% for AFB₁ and 72% for OTA. Limits of detection (LOD) for the AFB₁, AFG₁ and OTA were estimated as equivalent to 0.03 µg/kg, 0.05 µg/kg and 0.3 µg/kg, respectively.

1. GİRİŞ

Geleneksel Türk kahvaltısının ayrılmaz bir parçası olan zeytin ülkemizde çeşitli şekillerde değerlendirilmektedir. Türkiye’de üretilen zeytinin 1/3 ü sofralık olarak, kalanı zeytinyağı üretimi için kullanılmaktadır. Zeytin ve zeytinyağı, insan vücudunda sentezlenemeyen ve biyolojik öneme sahip olan esansiyel yağ asitlerini içermesi nedeniyle sağlıklı beslenmede büyük öneme sahiptir.

Türkiye dünya zeytin üretiminde, 2008/2009 yılı verilerine göre İspanya, Mısır ve Yunanistan ile birlikte ilk sıralarda yer almaktadır (Url-1). Ancak dünya genelinde zeytin ihracat miktarlarına bakıldığında Türkiye’nin son sıralarda yer aldığı görülmektedir. Bunun en büyük nedeni, zeytin işletmelerimizin çoğunun küçük ölçekte olması sonucunda standart kalitede üretimin yapılamamasıdır.

Geleneksel zeytin üretiminde fermentasyon esnasında salamura yüzeyinde oluşan film tabakasında *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsi küfler tespit edilmiştir (Gourama ve Bullerman, 1988). Zeytinde *Penicillium* türleri baskın olup (%68,25), bunu *Aspergillus* türleri (%15,87) izlemektedir (Şahin ve diğ., 1999). Türkiye’de Ege ve Marmara bölgesinden toplanan 55 farklı salamura siyah zeytinde, 15’i *Penicillium*, 12’si *Aspergillus*, 2’si *Alternaria* ve 1’i *Cladosporium* olmak üzere toplam 30 küf suşu izole edilmiştir (Eltem ve Öner, 1995).

Depolama, paketlenme ve dağıtım esnasında, uygun çevresel koşulların varlığında başta küfler olmak üzere birçok mikroorganizma zeytinde bozulmaya neden olabilmektedir. Bu durum, önemli ekonomik kayıpların yanı sıra insan ve hayvan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Siyah zeytinde maksimum 350 µg/kg düzeyinde citrinin (Heperkan ve diğ., 2006) ve az miktarlarda aflatoksin B₁ (Daradimos ve diğ., 2000) varlığı bildirilmiştir. 2002-2003 yıllarında Sicilya’da zeytinyağında 6-40 ng/kg aflatoksin ve 52-244 ng/kg okratoksin A (OTA); zeytinlerde ise 31-1518 ng/kg aflatoksin ve 101-8391 ng/kg OTA tespit edilmiştir. Sadece 1 zeytinyağı ve 6 zeytin örneğinin, aflatoksin ve OTA’yı birarada içerdiği bildirilmiştir (Finoli ve diğ., 2005).

Fas'ta perakende satış yeri ve süpermarketten temin edilen 10 adet zeytin örneğinde yapılan bir çalışmada 6/10 örnekte 0,31-1,02 µg/kg düzeyinde OTA ve 3/10 örnekte 0,5-5,0 µg/kg düzeyinde aflatoksin B₁ belirlenmiştir. (El Adlouni ve diğ., 2006).

İnsan sağlığına zararlı etkileri göz önünde bulundurularak gıdalardaki mikotoksin miktarları kontrol altında tutulmalıdır. Bu çalışmada ilk olarak Türkiye'de piyasadan tesadüfi olarak temin edilmiş 30 sofralık siyah zeytin ve 30 zeytinyağı örneğinde aflatoksin B₁ ve OTA varlığının incelenmesi planlanmıştır. Analiz yapılan zeytin ve zeytinyağı örneklerinde yaygın bir şekilde OTA varlığının belirlenmesi üzerine, çalışmanın ikinci aşamasında *Aspergillus carbonarius* ve *Penicillium verrucosum* spor süspansiyonları ile aşılanan sofralık siyah zeytin örneklerinde OTA oluşumuna sıcaklık etkisinin 21 günlük inkübasyon süresince incelenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışma ile hem ülke ekonomisine hem de literatüre katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Zeytin

Zeytin, Türkiye ve dünyada çeşitli şekillerde tüketilen önemli tarımsal ürünlerden biridir. Zengin besinsel bileşimi nedeniyle sağlıklı beslenmede büyük öneme sahiptir.

2.1.1 Zeytinin tanımı

Sofralık zeytin, zeytin ağacı (*Olea europaea*) meyvelerinin tekniğine uygun olarak acılığı giderilip, laktik asit fermentasyonuna tabi tutularak veya tutulmayarak gerektiğinde laktik asit ve/veya diğer katkı maddeleri ilave edilen, pastörizasyon veya sterilizasyon işlemine tabi tutularak veya tutulmadan elde edilen meyve bütünlüğü bozulmamış üründür (TS-774, 2003).

2.1.1.1 Zeytinin tarihçesi

Zeytin ağacı ve meyvesinin tarihçesi antik çağlara dayanmaktadır. Zeytin ağacı, dünyada yetiştirilen en eski ağaçlar arasındadır. Ana vatanı Anadolu olup, 5000 yıl önce Akdeniz'e (Aktan ve Kalkan, 2000), sonra Asya, Kuzey Afrika, Güney Avrupa (Garcia ve diğ., 2005), Yunanistan ve Roma'ya yayıldığı belirtilmektedir. Birkaç yüzyıl öncesinde de Kuzey ve Güney Amerika, Japonya ve Avustralya'ya ulaşmıştır (Aktan ve Kalkan, 2000). Özellikle güney ve kuzey yarım kürenin 30°-40° enlemleri zeytin üretim kuşağı olarak belirtilmektedir (Öztürk, 2006). Zeytin ağacının meyvesi, sofralık zeytin üretimi ve zeytinyağı ekstraksiyonunda kullanılmaktadır (Garcia ve diğ., 2005).

2.1.1.2 Zeytinin biyolojisi

Zeytin ağaçları; kışları ılık ve yağmurlu (sıcaklığın en çok -8°C ye düştüğü), ilkbahar ve sonbaharı serin ve yağışlı, yazları ise kurak olan (sıcaklığın en fazla 40°C ye yükseldiği) bölgelerde, kıyı şeridinde yetişmektedir. Yıllık yağış en az 400 mm olmalıdır. Kalkerli kumlu, nemli ve besin maddeleri açısından zengin topraklarda daha iyi gelişmektedir (Darı, 2005).

Zeytin çeşidi, sofralık zeytin ve zeytinyağının kalitesini etkileyen en önemli faktördür. Bu nedenle zeytin çeşidinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Ancak, bazı çeşitlerin farklı bölgelerde birden fazla isim alması ya da farklı çeşitlerin aynı ismi alması nedeniyle çeşidin belirlenmesinde zorluklar yaşanmaktadır (Garcia ve diğ., 2005). Zeytin ağaçları birçok varyeteye sahip olup, fenotipik ve genetik bazı farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar genellikle meyvenin boyutu, rengi, yağ içeriği ve yağ asidi kompozisyonundan kaynaklanmaktadır (Boskou, 2006).

2.1.1.3 Zeytin üretimine ayrılan alan

Akdeniz Bölgesi, zeytin ağacının yetişmesi için gerekli olan ekolojik ve klimatolojik özelliklerin tamamına sahiptir ve dünya zeytin varlığının %96'sı bu bölgede bulunmaktadır (Aktan ve Kalkan, 2000). Dünyada ve Türkiye’de zeytin üretimine ayrılan alan Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 : 2000-2008 yılları arasında zeytin üretimine ayrılan alan ve verimlilik (Url-2).

Ülkeler	Alan	Verim	Üretim	
	(ha)	(hg/ha)	(ton)	(%)
Cezayir	229931	10989	250664	1,5
Arjantin	42333	31079	131622	0,8
Mısır	48836	61185	298667	1,8
Fransa	17626	12441	21979	0,1
Yunanistan	785145	30638	2405707	14,2
İtalya	1161275	29957	3475754	20,5
Fas	537733	11253	601221	3,5
Peru	8182	52042	43036	0,3
Portekiz	372281	7930	295848	1,7
İspanya	2464877	22993	5668872	33,4
Tunus	2062149	4000	838778	4,9
Türkiye	637993	21209	1350761	7,9
ABD	13446	67793	91272	0,5
Avrupa Birliği	4813186	24694	11889767	70,0
Dünya	9393529	18184	16991103	100,0

Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi zeytin üretimine en fazla alanı İspanya ayırmaktadır. İspanya’yı Tunus, İtalya, Yunanistan ve Türkiye takip etmektedir. Zeytin ekilen alanların verimliliği incelendiğinde ABD, Mısır ve Peru’da hektar başına elde edilen verimin fazla olduğu dikkat çekmektedir. Türkiye’de ise zeytin ekili alanlardan

hektar başına elde edilen verim düşüktür. 2000-2008 yılları arasında üretilen ortalama zeytin miktarlarına bakıldığında, İspanya (%33,4), İtalya (%20,5), Yunanistan (%14,2) ve Türkiye (%7,9) dünya zeytin üretiminde ilk sıralarda yer almaktadır. Şekil 2.1’de zeytin ağacı ve Şekil 2.2’de zeytin meyvesinin görünümü verilmiştir.



Şekil 2.1 : Zeytin ağacının görünümü (Url-3).



Şekil 2.2 : Zeytin meyvesinin görünümü (Url-4).

Türkiye, coğrafi konumu ve sahip olduğu Akdeniz iklim özellikleri ile dünyanın önde gelen zeytin üreticisi ülkelerinden biridir. Zeytin, Türkiye’de daha çok Marmara ve Ege Bölgelerinde yetiştirilmektedir.

2.1.1.4 Zeytinin sınıflandırılması

Zeytin meyvesi anatomik olarak kabuk, et ve çekirdek olmak üzere üç ana kısımdan oluşmaktadır. Orta ve küçük boyda zeytinler (> 285 zeytin/kg) yağ ekstraksiyonu için uygun olup, et/çekirdek oranı düşüktür (4,1-7,1). Büyük boyda olan zeytinler (60-200 zeytin/kg) sofralık zeytin üretimi için daha uygun olup, et/çekirdek oranı

yüksektir (7,1-10,1) (Garcia ve diğ., 2005; Boskou, 2006). Ara kategoride olan zeytinler ise hem sofralık zeytin hem de zeytinyağı üretiminde kullanılabilir.

Dünyada hasat edilen zeytinin %90'ı yağ üretimi ve %10'u sofralık zeytin üretimi için ayrılmaktadır (Garcia ve diğ., 2005). Türkiye’de ise üretilen zeytinin yaklaşık olarak 1/3 ü sofralık olarak, kalanı zeytinyağı üretimi için kullanılmaktadır (Uylaşer ve Karaman, 2005). Zeytinden ayrıca, zeytin ezmesi de yapılmaktadır (Dıraman ve Arıcı, 2002). Sofralık zeytin üretiminde kullanılan zeytinlerin %85’ini siyah, %15’ini yeşil zeytin oluşturmaktadır (Uylaşer ve Karaman, 2005).

Memecik, Ayvalık, Gemlik, Domat, Uslu, Memeli, Manzanilla, Yamalak, Edincik su, İzmir sofralık, Çelebi, Halhalı ve Tavşan yüreği Türkiye’de yetiştirilen başlıca zeytin çeşitleridir (Aktan ve Kalkan, 2000).

2.1.1.5 Zeytinin besinsel bileşimi

Ham zeytin meyvesi, et (meyve ağırlığının %70-90’ı) ve çekirdekten (meyve ağırlığının %30-10’u) oluşmaktadır (Garcia ve diğ., 2005). Zeytinin bileşimi Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 : Zeytinin bileşimi (Tetik, 2001).

Bileşen	Miktar (%)
Su	50-70
Yağ	15-30
Protein	1-3
Selüloz	1-3
Kül (Mineral madde)	1-5
Karbonhidratlar (glukoz ve diğerleri)	2-6

Antosiyaninler (siyanidin ve delfinidin glukozidler), flavonoller (quercetin 3 rutinozid), flavonlar (luteolin ve apigenin glukozidler), fenolik asitler (hidroksibenzoik, hidroksisinamil vb.), fenolik alkoller (tyrosol ve hidroksityrosol), oleuropein, demetiloleuropein (demethyloleuropein) zeytinde bulunan önemli bileşenlerdir (Boskou, 2009).

Fenolik bileşikler, çoğunlukla *ortho*-difenol bileşikler ve bunların glikozidleri oluşturmaktadır. Bu bileşikler, özellikle laktik asit bakterilerine karşı antimikrobiyal

özelliğ gösterdiğinden fermentasyonda önemli role sahiptir. Fenolik bileşikler ayrıca, olgunlaşma esnasında renk gelişiminde ve salamura içerisinde olgun zeytinlerin hazırlanması için uygulanan karartma işlemlerinde önemlidir (Lund ve diğ., 2000).

Alkali ile işlem görmemiş zeytinler, oleuropein içerikleri nedeniyle çok acı lezzette olduğundan tüketilemez formdadır (Garcia ve diğ., 2005). Oleuropein'in, alkali ile hidrolizi sonucunda giderilen acılık, alkalinin uzaklaştırılması sonrasında tekrar oluşmaz (Luh ve Woodroof, 1988).

Zeytin, fermente olabilir şekerlerden glukoz (meyvenin etli kısmının %1-3'ü), fruktoz (%0,2-1,1), az miktarda sakkaroz ve mannitol içermektedir. Sitrik asit, okzalik asit ve malik asit, meyvenin etli kısım ağırlığının %0,5-1'ini oluşturmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

Antosiyanin'ler zeytinde bulunan en önemli pigmentlerdir. Bunlar; siyanidin 3 glikozid, siyanidin 3 rutinozid, siyanidin trioizid ve siyanidin 3 soforosid olarak belirtilmiştir. Antosiyanin'ler zeytinin gelişimi esnasında maksimum seviyeye ulaşınca kadar hızla artar, zeytin aşırı olgunlaştığında azalır. Pigment oluşumunda, ışığın etkisi önemlidir. Işıktaki gelişen meyvelerde, karanlıktakilere göre 10 kat daha fazla antosiyanin bulunmuştur (Luh ve Woodroof, 1988).

Zeytinde yağ akümüasyonu Temmuz-Ağustos aylarında başlar, Kasım ayında maksimuma ulaşır. Meyve olgunlaşma periyodunun ilk safhasında yeşil renktir. Daha sonra yüzeydeki klorofiller yavaş yavaş antosiyaninler ile yer değiştirir. Sonbahar ve kış döneminde meyve siyah renk olur ve yağ içeriği maksimum değere ulaşır (Boskou, 2006).

2.1.2 Sofralık zeytin üretimi ve ticareti

Zeytin üretimi en çok Akdeniz Bölgesinde yoğunlaşmıştır. Özellikle üretici ülkelerin ekonomisinde önemli rolü bulunmaktadır.

2.1.2.1 Dünyada ve Türkiye'de sofralık zeytin üretimi

En önemli fermente gıdalardan biri olan zeytin, birçok ülkede üretilmektedir. Üretilen zeytin miktarı, yıllara göre değişiklik göstermektedir. Bunun nedeni, periyodisite olarak tanımlanmakta olup, ağaçların iki yılda bir meyve vermesidir.

Dünya sofralık zeytin üretimine ait değerler Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3 : Dünya sofralık zeytin üretimi (1000 ton) (Url-1).

Ülkeler	Yıllar								
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
İspanya	415,8	575,4	448,3	579,4	537,5	420,3	499,7	556,1	475,0
Mısır	70,0	135,0	340,0	95,0	194,5	200,0	436,0	432,0	400,0
Türkiye	224,0	85,0	165,0	125,0	240,0	280,0	240,0	200,0	250,0
Yunanistan	85,0	115,0	117,0	92,0	115,0	125,5	108,0	95,0	120,0
Fas	80,0	90,0	80,0	120,0	80,0	100,0	90,0	100,0	110,0
Suriye	142,0	80,0	170,0	120,0	200,0	120,0	200,0	100,0	100,0
İtalya	65,0	60,0	66,0	65,0	63,4	61,0	80,0	80,0	80,0
ABD	60,0	120,0	81,0	100,0	87,0	116,0	18,0	109,0	48,0
Arjantin	30,0	38,0	50,0	70,0	60,0	85,0	75,0	95,0	85,0
Portekiz	8,7	12,0	11,0	11,3	11,4	8,0	19,2	11,0	13,0
Fransa	1,8	2,0	2,0	2,0	2,0	1,2	1,5	1,5	1,5
Diğer	160,70	161,10	243,20	222,30	261,70	245,00	321,10	373,90	349,50
Toplam	1.343,0	1.473,5	1.773,5	1.602,0	1.852,5	1.762,0	2.088,5	2.153,5	2.032,0

Çizelge 2.3'te görüldüğü gibi İspanya bu pazarda en büyük paya sahiptir. İspanya'dan sonra Mısır, Türkiye ve Yunanistan en önemli zeytin üreticileridir.

Türkiye'de zeytin üretim miktarı 2000/2001 yıllarında 224,000 ton iken, 2008/2009 yıllarında bu değer 250,000 tona yükselerek 1,1 kat artış göstermiştir. Dünya zeytin üretiminde Türkiye üçüncü sırada yer almaktadır.

Üretici ülkeler çeşitliliği artırma yoluna giderek, uluslararası ticarete pay almak istemektedirler. İspanya son yıllarda natürel siyah zeytin ve konserve siyah-olgun zeytin üretimine, Yunanistan salamura natürel siyah zeytin üretiminin yanında yeşil zeytin üretimine başlamıştır. Zeytin üretim ve saklama yöntemlerindeki bilimsel çalışmalar, üretim miktarlarının arttırılmasına olanak sağlamaktadır (Fernandez ve diğ., 1997).

Zeytin tipine göre üretim incelendiğinde, siyah zeytinin önemli bir kısmını natürel siyah zeytinler oluşturmaktadır. Değişken renkli zeytinlerin büyük çoğunluğunu ise Kaliforniya tipi zeytinler oluşturmaktadır (Fernandez ve diğ., 1997).

2.1.2.2 Sofralık zeytin ihracatı

Zeytin çeşitlerine göre ihracatçı ülkeler değişmektedir. İspanya, Arjantin, Yunanistan ve Fas yeşil zeytin, Yunanistan, Fas ve Türkiye natürel siyah zeytin, İspanya ve Fas değişken renkli zeytin ihracatı yapmaktadır (Fernandez ve diğ., 1997). Türkiye’de ve dünyada sofralık zeytin ihracatı Çizelge 2.4’te verilmiştir.

Çizelge 2.4 : Dünya sofralık zeytin ihracatı (1000 ton) (Url-1).

Ülkeler	Yıllar								
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
İspanya	165,7	172,0	188,8	169,7	184,1	187,4	193,0	194,7	200,0
Mısır	12,0	25,0	80,0	45,0	15,0	7,0	100,0	110,0	100,0
Fas	62,5	61,0	52,0	69,5	59,0	63,0	58,5	65,0	72,0
Arjantin	29,0	24,0	35,0	45,0	50,0	61,0	70,0	86,0	70,0
Türkiye	32,0	56,0	35,0	51,0	58,0	54,0	55,0	40,0	60,0
Yunanistan	31,0	34,0	30,0	28,0	38,0	51,0	39,0	30,0	45,0
ABD	4,0	4,0	5,5	4,0	4,5	5,0	4,0	4,0	4,0
Suriye	8,0	16,0	6,0	18,5	34,0	23,0	29,0	23,0	17,0
Portekiz	5,0	3,1	4,1	5,6	5,3	6,5	18,5	9,7	10,8
İtalya	1,3	2,0	1,9	2,0	2,1	2,3	3,0	3,0	3,5
Fransa	1,4	1,5	2,3	1,4	1,9	2,1	2,1	1,9	1,9
Diğer	12,1	22,9	19,9	22,3	28,1	40,7	25,9	45,2	44,3
Toplam	364,0	421,5	460,5	462,0	480,0	503,0	598,0	612,5	628,5

Türkiye’de sofralık zeytin ihracat miktarı 2000/2001 yıllarında 32,000 ton, iken 2008/2009 yıllarında 60,000 ton değerine yükselmiştir. İhracat miktarı son on yıl içerisinde yaklaşık olarak iki kat artmıştır. Ancak dünyadaki ihracat miktarlarına bakılacak olursa çok geride olduğumuz görülmektedir.

Türkiye dünya zeytin üretiminde üçüncü sırada yer alırken, sofralık zeytin ihracatında aynı başarıyı gösterememektedir. İhraç edilen miktarlar dünya geneline bakıldığında oldukça düşüktür. Bunun en büyük nedeni, zeytin işletmelerimizin çoğunun küçük ölçekte olması sonucunda standart üretimin yapılamaması, teknolojiadaki yeniliklerin takip edilmemesi ve diğer ülkelerin tüketim tercihlerine uygun üretimin gerçekleştirilmemesidir (Oral ve Heperkan, 1999).

2.1.2.3 Sofralık zeytin ithalatı

İthal edilen zeytin türleri ülkelere göre farklılık göstermektedir. A.B.D., ve Fransa’da İspanyol tipi salamuralanmış yeşil zeytin, Bulgaristan ve Romanya’da ise Grek tipi

salamuralanmış natürel siyah zeytin ithalatı yapılmaktadır (Fernandez ve diğ., 1997). Zeytin ithal eden ülkeler Çizelge 2.5’te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5 : Dünya sofralık zeytin ithalatı (1000 ton) (Url-1).

Ülkeler	Yıllar								
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
ABD	111,0	113,0	115,0	117,5	124,5	120,0	148,5	136,5	155,0
Brezilya	45,0	50,0	46,0	51,0	56,0	55,0	60,5	73,5	74,0
Fransa	26,4	23,4	34,8	25,7	30,5	30,5	27,3	28,3	28,5
Kanada	20,5	22,0	23,5	23,5	23,5	25,0	25,5	25,5	26,0
Almanya	12,1	13,3	12,3	13,0	12,7	12,8	14,5	15,5	15,8
Romanya	-	-	-	-	-	-	17,9	18,0	18,0
Rusya	3,5	4,0	4,0	4,5	45,0	45,0	70,0	80,0	90,0
Türkiye	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Diğer	139,5	174,3	213,9	205,8	187,8	206,7	157,8	158,7	157,7
Toplam	358,0	400,0	449,5	441,0	480,0	495,0	522,0	536,0	565,0

Çizelge 2.5’te görüldüğü gibi A.B.D., Rusya ve Brezilya en çok zeytin ithalatı yapan ülkelerdir.

2.1.2.4 Sofralık zeytin tüketimi

Zeytin üretimi ve tüketimi en çok Akdeniz Bölgesinde yoğunlaşmıştır. Kıbrıs, Lübnan, Libya, Tunus, Hırvatistan ve Avustralya’da zeytin üretim miktarı az olup, tamamı yerel olarak tüketilmektedir (Garcia ve diğ., 2005). Dünya zeytin tüketimi Çizelge 2.6’da verilmiştir.

Çizelge 2.6 : Dünya zeytin tüketimi (1000 ton) (Url-1).

Ülkeler	Yıllar								
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
Mısır	57,0	75,0	190,0	138,0	200,0	170,0	300,0	350,0	308,0
İspanya	163,6	215,6	192,7	205,0	167,4	214,1	243,8	265,0	265,0
ABD	185,0	205,0	205,0	210,0	205,0	220,0	220,0	233,5	235,0
İtalya	145,0	150,0	150,0	150,0	147,2	139,0	122,0	122,0	122,0
Türkiye	125,0	100,0	114,0	96,0	175,0	221,0	180,0	190,0	200,0
Almanya	35,0	36,5	37,4	39,5	41,4	40,0	48,9	57,0	58,9
Fransa	39,0	39,0	62,0	44,9	53,9	53,9	55,1	53,1	53,0
Diğer	553,90	561,40	776,90	786,60	841,60	771,00	909,20	889,40	904,10
Toplam	1.303,5	1.382,5	1.728,0	1.670,0	1.831,5	1.829,0	2.079,0	2.160,0	2.146,0

Çizelge 2.6’da görüldüğü gibi dünyada zeytin tüketimi en fazla Mısır, İspanya, A.B.D. ve Türkiye’de olmaktadır.

2.1.3 Sofralık zeytin üretim yöntemleri

Zeytinin sofralık olarak hazırlanması antik çağlara dayanmaktadır. Zeytin meyvesinin rengi; olgunlaşma esnasında yeşilden mora, sonra mavimsi renge ve en son olarakta aşırı olgunluk safhasında siyah renge dönüşmektedir (Garcia ve diğ., 2005). Meyveler, renkleri yeşilden siyaha değişen çeşitli olgunluk dönemlerinde hasat edilebilmektedir (Lund ve diğ., 2000). Sofralık zeytinler, hasattaki renklerine göre ya da uygulanan prosese veya son ürünün rengine göre sınıflandırılabilir (Garcia ve diğ., 2005).

Genel olarak sofralık zeytinler düşük yağ ve yüksek şeker içeriğine sahiptir (Garcia ve diğ., 2005). Sofralık zeytin işlemede birçok yöntem vardır. Uluslararası ticarete özellikle İspanyol tipi yeşil zeytin, Kaliforniya tipi siyah zeytin ve geleneksel olarak işlenen Grek tipi siyah zeytin öneme sahiptir (Garcia ve diğ., 2005; Arroyo-López ve diğ., 2008).

Zeytinler, kullanılan üretim yöntemine bağlı olarak farklı olgunluk zamanlarında hasat edilmektedir. Alkali işlemi, salamura uygulaması ve fermentasyon periyodu, zeytin çeşidine göre değişiklik göstermektedir (Prajapati ve Nair, 2003). Salamura konsantrasyonu, zeytinin boyutuna ve varyetesine bağlı olarak %5-15 aralığında değişmektedir (Bevilacqua ve diğ., 2009).

İspanyol ve Kaliforniya tipi zeytin işlemede, aromatik maddelerden biri olan oleuropein’in neden olduğu acılık alkali muamelesi ile giderilmektedir. Grek tipi zeytin üretiminde ise, meyveler doğrudan salamura içerisine konulmakta ve acılık kısmen uzaklaştırılmaktadır. Bu nedenle, zeytinler meyvemsi bir tada ve acımsı bir lezzete sahiptir (Luh ve Woodroof, 1988; Wood, 1998; Aktan ve Kalkan, 2000).

2.1.3.1 İspanyol tipi yeşil zeytin üretimi

İspanyol tipi yeşil zeytin üretiminde, zeytinler yeşil ile saman sarısı arasında renge ulaştığında toplanmaktadır (Lund ve diğ., 2000; Darı, 2005). Polifenollerin degradasyonu ve zeytindeki hücre duvarı geçirgenliğini arttırmak için seyreltik NaOH (%2-3) solüsyonu ile muamele edilir (Arroyo-López ve diğ., 2008). Silindirik ya da küresel polyester ve fiber glass tanklarda, oleuropein’i hidrolize etmek için 5-7

saat bekletilmektedir (Lund ve diğ., 2000). Bu işlem ile acı bir glikozid olan oleuropein, glukoz ve aglikon'a indirgenir. Bunlarda elenoik asit ve β -3,4-dihidroksi-feniletıl gibi basit moleküllere parçalanmaktadır (Robinson, 2000).

Alkali, meyve etinin 2/3'üne temas ettiğinde işleme son verilmekte ve zeytinler defalarca su ile yıkanmaktadır. İşlemin uygulandığı tankın altından alkali boşaltılmadan önce, yukarıdan çeşme suyu verilmeye başlanmaktadır. Böylece zeytinlerin oksidasyon ile kararması önlenmiş olur (Aktan ve Kalkan, 2000). Yıkama işlemiyle, oleuropein ve onun hidroliz ürünleri, diğer polifenoller ve bazı fermente olabilir şekerler uzaklaştırılmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

Zeytinler laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen fermentasyona izin vermek için, %5-6 NaCl içeren salamuraya konulmaktadır. Zeytinler, bir sonraki işleme kadar aynı salamurada bekletilebilir. Tuz konsantrasyonu %8'e çıkarıldıktan sonra satılmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

2.1.3.2 Kaliforniya tipi siyah zeytin üretimi

Kaliforniya tipi siyah zeytin üretiminde, salamurada depolanmış veya olgunlaşma safhasında kararmış zeytinler kullanılabilir (Wood, 1998; Arroyo-López ve diğ., 2008). Zeytinlerin rengi sarımsak-yeşil ile pembe arasında değişmektedir (Lund ve diğ., 2000). Zeytinler, çeşide ve alkali uygulaması öncesinde depolanma süresine bağlı olarak %0,5-1,5 NaOH solüsyonu ile kısa süreli olarak üç kez işlem görmektedir. Alkali, meyvenin tamamına temas ettiğinde işleme son verilmekte ve alkali uzaklaştırılmaktadır. Zeytinler yıkanmak suretiyle alkaliden tamamen arındırılmaktadır. Bu yöntemde, zeytinler hava ile temas etmekte ve oksidasyon ile kararma gerçekleşmektedir (Wood, 1998).

Siyah renk stabilizasyonu, laktat ya da glukonat demir solüsyonuna daldırma ile sağlanmaktadır (Arroyo-López ve diğ., 2008). Zeytinler, %2,5-5,0 NaCl içeren salamura solüsyonu ile konservelenmekte ve sterilize edilmektedir (Lund ve diğ., 2000). Ticari olarak; çekirdekli, çekirdeksiz, dilimlenmiş ve zeytin ezmesi olarak tüketime sunulmaktadır (Arroyo-López ve diğ., 2008).

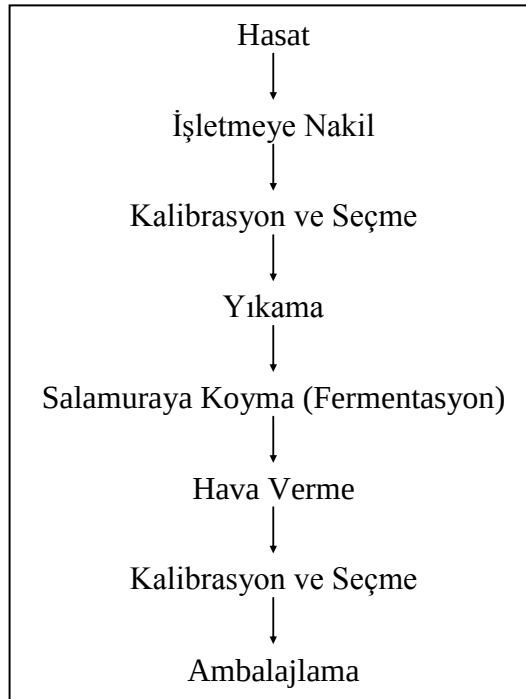
2.1.3.3 Grek tipi natürel siyah zeytin üretimi

Grek tipi natürel siyah zeytin, renkleri mor ile siyah arasında değişen zeytinlerden hazırlanmaktadır. Yıkama işlemi sonrasında tank içerisine konulur ve üzerine %8-10 NaCl içeren salamura ilave edilir (Lund ve diğ., 2000).

Zeytinler doğal fermentasyona maruz kalmaktadır. Fermentasyon karakteristiğinde fiziko-kimyasal koşullar, sıcaklık ve tuz içeriği gibi faktörler etkilidir (Arroyo-López ve diğ., 2008). Fermentasyon zeytinlerde veya tanklarda doğal olarak bulunan mikroorganizmalar ile gerçekleşmektedir. Fermentasyonda, özellikle mayalar önemli rol oynamaktadır. Salamura ise fermente olabilir karbonhidratları içerdiği için, laktik asit bakterilerinin gelişimini teşvik eden bir ortam sağlamaktadır (Wood, 1998). Zeytinler, kısmende olsa doğal acılığını kaybedinceye kadar salamura içerisinde tutulur. Fermentasyon işlemi sonrasında pazar isteklerine göre boyutlandırılır, sınıflandırılır ve paketlenir (Arroyo-López ve diğ., 2008).

2.1.3.4 Türk tipi salamurada natürel siyah zeytin üretimi

Türk tipi salamurada natürel siyah zeytin üretimi Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 : Türk tipi natürel siyah zeytin üretimi akış şeması (Aktan ve Kalkan, 2000).

Zeytinler, renkleri kıızıdan siyaha dönme aşamasında ve yüzeyde kırışıklıklar meydana gelmeden önce hasat edilmelidir. Hasat edilen zeytinler, delikli plastik kasalar içerisinde işletmeye nakledilmelidir. İşletmeye gelen zeytinler öncelikle elenirler, sonra bozuk, çürük taneler ve yabancı maddeler ayıklanmak suretiyle uzaklaştırılır (Aktan ve Kalkan, 2000).

Ayıklama sonrasında yıkanarak toz, toprak ve mikroorganizma yükünden arındırılan zeytinler fermentasyon tanklarına alınmaktadır. Tankın içerisine salamura ilave edilir. Laktik asit bakterilerinin en iyi şekilde çalışması için gereken optimum tuz konsantrasyonu %6-8 olarak belirtilmiştir. Bu nedenle salamura tuz konsantrasyonu en çok %9 oranında olmalıdır. Aksi halde laktik asit bakterileri haricinde asetik asit, alkol ve kötü koku üreten tüm mikroorganizmalar faaliyet gösterebilir ve ortamda baskın olabilirler (Aktan ve Kalkan, 2000).

Zeytinlere herhangi bir ön işlem uygulanmadığından, meyvedeki çözünür bileşenlerin salamuraya geçişi çok yavaş olmakta, dolayısıyla da fermentasyon süresi uzamaktadır. Fermentasyon, yaklaşık olarak 9-10 ay sürmektedir (Özay ve diğ., 1994). Tanklara hava verildiğinde fermentasyon hızlandırılmakta ve tat gelişimi çabuk oluşmaktadır. %6-8 tuz konsantrasyonu ile fermentasyona başlayıp, pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu kontrolü düzenli olarak yapıldığında arzu edilen tat oluşumu için gereken süre 3 aya indirilebilir (Aktan ve Kalkan, 2000).

Fermentasyon sonrasında salamuradan çıkarılan zeytinler havalandırılır ve oksidasyon ile siyah renk oluşumu sağlanır. Kararan zeytinlere, tekrar kalibrasyon ve seçme işlemi uygulanır. Yaralı, ezik ve açık renkli zeytinler ayrıldıktan sonra, zeytinler boyutlarına göre sınıflandırılıp ambalajlanırlar (Aktan ve Kalkan, 2000).

Zeytinler salamurasız olarak açıkta veya naylon torbalarda piyasaya sunulacaksa, zeytinlere salamura içerisinde iken sodyum benzoat (%0,05-0,1) ilave edilerek tuz oranı %9-10 seviyesine getirilmelidir. Zeytinler, salamura içerisinde tenekelerde veya cam kavanozlarda pastörizasyon sonrasında piyasaya sunulacaklarsa, koruyucu madde ilavesine gerek yoktur. Salamura tuz konsantrasyonunun en çok %7 olması gerektiği belirtilmiştir (Aktan ve Kalkan, 2000).

Türkiye’de bazı işletmelerde, siyah zeytinler %1’lik NaOH çözeltisinde tatlandırıldıktan sonra salamura içerisinde kısa süreli fermentasyona uğratarak tüketime sunulmaktadır. Bu şekilde üretilen zeytinler, Türk damak tadına uygun

değildir. Zeytin fermentasyonunda kullanılan salamura konsantrasyonu %10'u aştığında, fermentasyonda gelişmesi istenilen asıl mikroorganizma olan laktik asit bakterilerinin etkisi önemli ölçüde azalmakta, hatta bazen tamamen engellenmektedir. Zeytinlerin salamuraya alındığı zaman Kasım ayı başına denk geldiğinden, kış döneminde fermentasyon düşük sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Sıcaklıktaki düşüş ile laktik asit bakterilerin gelişimi tamamen olumsuz etkilenmektedir. Laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen fermentasyon olmadığında, ortamda bulunan tuza dayanıklı bakteri, maya ve küfler gelişmekte ve salamura yüzeyinde kefeke adı verilen film tabakası oluşmaktadır. Bu da ürünün yumuşamasına, bozulmasına ve hatta mikotoksinler ile kontamine olmasına neden olmaktadır (Uylaşer ve Şahin, 2004).

Uylaşer ve Şahin (2004) tarafından gerçekleştirilen çalışmada geleneksel Gemlik yönteminin günümüz koşullarına uyarlanması incelenmiştir. *L. plantarum* ile aşıl原因 ve %7 tuz içeriğine sahip salamurada 35 kg/m² baskı uygulanarak bekletilen zeytinler, 2,5 ayda tüketim olgunluğuna ulaşmıştır. Fermentasyon sonrasında zeytinde %2,5 tuz konsantrasyonu elde edildiğinden, ürünün dış pazarda da rahatlıkla satılabilecek kalitede olduğu bildirilmiştir.

2.1.4 Zeytin fermentasyonu

Zeytin fermentasyonu; *Enterobacteriaceae*, laktik asit bakterileri, diğer Gram negatif mikroorganizmalar ve mayaların yer aldığı kompleks bir mikrobiyotaya dayanmaktadır (Bevilacqua ve diğ., 2009).

Laktik asit bakterisi, sofralık zeytin fermentasyonunda son ürün kalitesini etkilemektedir. Zeytin stabilitesini sağlayan en etkili pH ve asitlik değeri, laktik asit bakterileri mevcudiyetinde gerçekleşmektedir (Fernández Gonzalez ve diğ., 1993). *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* (Prajapati ve Nair, 2003) ve *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus* spp. (Li, 2004) fermentasyondan sorumlu asıl organizmalardır. *Lb. plantarum* bakteriyosin üretebilme yeteneğinde olduğundan, ilave olarak inokülasyonuna ihtiyaç duyulabilir (Ruiz-Barba ve diğ., 1994; Li, 2004).

Sofralık zeytinlerde arzu edilen duyusal karakteristiğın gelişiminde mayaların rolü olduğu belirtilmektedir. Mayaların lipolitik aktivitesi sonucu oluşan uçucu bileşenler duyusal özellik üzerine etkilidir. Mayalar ayrıca meyveleri radikal oksidasyondan

koruma özelliğindedir. Hatta *Candida krusei* ve *Pichia membranifaciens* gibi bazı türler starter kültür olarak kullanılabilmektedir (Bevilacqua ve diğ., 2009).

Diğer taraftan bazı mayalar, zeytinde bozulmaya neden olabilmektedir. Özellikle, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri* ve *Pichia anomala* gaz cepçığı oluşumundan ve zeytinin yumuşamasından sorumludur. Bunun dışında, *Rhodotorula* türüne ait pembe mayalar (*R. rubra* ve *R. minuta*) salamurada gelişerek salamura yüzeyinde ince bir zar oluşturabilmekte ve poligalakturonazlar oluşturarak meyvenin yumuşamasına neden olabilmektedir (Bevilacqua ve diğ., 2009).

Mayaların düşük pH değerlerine direnci, ortamdaki laktik asidi tüketebilme yetenekleri ile ilişkilendirilmektedir. Bazı maya türleri salamuradaki asit miktarının düşmesine neden olduğundan, salamurada çoğalmaları arzu edilmez. Diğer taraftan, alkali pH değeri de dikkate alınmalıdır. Mayalar alkali ile muamele esnasında canlı kalabilmekte ve fermentasyonun ilk aşamasında üründe kolonize olabilmektedir (Bevilacqua ve diğ., 2009).

Perakende olarak, açıkta satılan zeytinler sıklıkla çevresel kontaminasyona maruz kalmaktadır. Bu nedenle, ürünlerdeki düşük pH içeriği ve laktik asit bakteri popülasyonu ürünün korunmasında önemli role sahiptir (Rubia-Soria ve diğ., 2006).

2.1.4.1 Yeşil zeytin fermentasyonu

Yeşil zeytinlerin fermentasyonunda, dominant role sahip olan laktik asit bakterileri etkilidir. Alkali uygulamasını ve yıkamayı takiben zeytinler, fermentasyon esnasında NaCl konsantrasyonu %5-6 olacak şekilde salamuralandırılmaktadır (Lund ve diğ., 2000). Zeytindeki şekerler, vitaminler ve aminoasitler osmozis ile salamura solüsyonu içerisine geçmektedir. Salamura yavaş yavaş laktik fermentasyonu oluşturan mikroorganizmaların gelişimi için uygun bir besi ortamına dönüştürülmektedir (Robinson, 2000).

Fermentasyonun ilk aşamalarında; Gram negatif çubuklar, Enterobacteriaceae (koliformlar) ve *Bacillus* spp. dominant haldedir. Bunlar zeytinlerden, tanklardan ve yıkama suyundan kaynaklanan kontaminantlardır. Bu aşamada Enterobacteriaceae ve *Aeromonas* spp. tarafından gaz oluşumu (CO₂, H₂) gözlenmektedir (Lund ve diğ., 2000). Bozulma etkeni olan bu bakteriler, laktik asit bakterileri tarafından asit üretimine bağlı olarak hızla ortadan kaybolmaktadır (Robinson, 2000). Fermentasyon ilerledikçe, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* türleri görülür (Li, 2004).

Fermentasyonun ikinci aşamasında *Lactobacillus plantarum* ve daha az miktarda *Lactobacillus delbrückii* ortama hakim olmaktadır (Lund ve diğ., 2000). Fermentasyonun ilk aşaması pH 6 ya düşünceye kadar devam etmektedir (Wood, 1998).

Fermentasyonun ikinci aşaması 12-15 gün sürebilir ve pH ideal olarak 4,0'ın altında bir değere düşmelidir. Bu pH düşüşü, fermente olabilir şeker konsantrasyonuna ve zeytinde işleme esnasında oluşan organik asit tuzlarından dolayı tamponlanma kapasitesine bağlıdır (Lund ve diğ., 2000). Düşük pH, ürün stabilitesi için önemlidir. Aksi halde, Gram-negatif bakteri gelişimi ve *Clostridium botulinum* sporlarında çimlenme olabilmektedir (Arroyo-López ve diğ., 2008).

Fermentasyonun üçüncü aşaması, substrat tükenene kadar devam etmekte, yaklaşık olarak 25 gün sürmektedir. *Lactobacillus* türleri (özellikle *Lb. plantarum*) dominant haldedir ve maya florası ile birlikte yaşamaktadır. *Lb. plantarum*, gelişmesi için vitamin ve aminoasitlere ihtiyaç duymaktadır. Bazı mayalar ortama B vitaminleri sentezlemektedir. Fermentatif mayalar, fermente olabilir şekerlerin önemli bir kısmını kullanmaktadır. Bunların etanol, etilasetat ve asetaldehit gibi metabolitleri, ürünün karakteristik duyuşal özelliklerine katkıda bulunmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

Oksidatif mayalar, yüzeysel filmler olarak bulunabilirler. Bunlar laktik asidi okside ettiği, pH'ı yükselttiği ve bu suretle *Clostridium* spp. tarafından kötü koku oluşumu ile bozulmaya neden olduklarından anaerobik koşullar sağlanarak düşük miktarlarda tutulmalıdır. Oksidatif mayaların baskılanması, salamura yüzeyinin plastik filmlerle kaplanması ile sağlanabilir. Fermentasyonun sonunda, muhtemel *Propionibacterium* (pH'ın artmasına ve koku oluşumu ile bozulmaya neden olabilir) gelişiminin baskılanması için, tuz konsantrasyonu %8'e yükseltilir (Lund ve diğ., 2000).

2.1.4.2 Konserve zeytin fermentasyonu

Konserve siyah zeytinlere, meyve yüzeyinde tamamen kararmanın sağlanması ve etli kısımda stabil siyah renk oluşumu için, tipik olarak alkali oksidasyonu uygulanmaktadır. Bu oksidasyon işlemi hasat sonrasında hemen uygulanabileceği gibi, meyveler salamura içerisinde depolanarak oksidasyon öncesinde fermentasyona uğratılabilir. Salamura içerisinde depolama esnasında hava enjeksiyonu ile oksidasyonun gelişmesi sağlanabilir. Salamuranın tuz konsantrasyonuna ve fenol

seviyesindeki genetiksel farklılıklara bağı olarak, mayalar ve laktik asit bakterileri fermentasyonda baskın halde bulunabilirler. Oksidasyon uygulaması öncesinde, laktik asit fermentasyonu ile tam bir koruma sağlanmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

Karartma işlemi için meyveler tekrar eden bir şekilde sodyum hidroksit solüsyonu (%1-2) ve içerisine basınç altında hava enjekte edilmiş olan su ile muamele edilmektedir. Genellikle bu işlemler 3 ila 5 kez uygulama ile başarılmaktadır. Fenolik bileşiklerin alkali oksidasyonu ile meyve yüzeyinde ve etli kısımda tam bir kararma sağlanmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

Renk oluşumu, orthodifenoller ve kafeik asitten polimer oluşumuna bağı olarak gerçekleşmektedir. Oksidasyon hızı, alkalilik miktarındaki artışa bağı olarak artmaktadır. Oluşan renk stabil olmayıp, renkteki bozulmaların önlenmesi için demirli glukonat ya da laktat solüsyonları eklenmektedir (Arroyo-López ve diğ., 2008). Demir renk üzerine etkisinin yanı sıra, olgun zeytin tekstürünün korunmasında rol oynamaktadır (Robinson, 2000).

Sodyum hidroksit solüsyonu, pH 8'e düşene kadar zeytinlerin yıkanması ile uzaklaştırılmaktadır. Bu işlemler sonrasında zeytinler, tenekelere ya da cam kavanozlara %1,5 tuz içeren salamura ile yerleştirilir ve sterilize edilirler (Lund ve diğ., 2000).

2.1.4.3 Natürel siyah zeytin fermentasyonu

Natürel siyah zeytinler, %8-10 tuz konsantrasyonuna sahip salamura içerisine konulmaktadır. Alkali işlemi uygulanmadığından çözünebilir bileşenlerin meyve yüzeyine difüzyonu yavaş olmaktadır. Bu nedenle fermentasyon prosesi de yavaştır (Lund ve diğ., 2000).

İlk günlerde Gram negatif bakteriler bulunur, ancak 1-2 hafta sonra yok olmaktadır. Bu fermentasyonda, mayalar baskındır ve 10-25 gün sonra sayıları maksimuma ulaşmaktadır. Fermentatif mayalar arasında *Saccharomyces oleaginosus* ve *Hansenula anomala* (Lund ve diğ., 2000), oksidatif mayalar arasında *Torulopsis*, *Candida*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida diddensii* ve *Pichia membranaefaciens*'in oksidatif türleri yer almaktadır (Lund ve diğ., 2000; Arroyo-López ve diğ., 2008). Ancak *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve ileri dönemlerde *Lactobacillus* türleri gelişmekte ve asit üretmektedirler (Lund ve diğ., 2000).

Fermentasyon ürünleri arasında; laktik asit, asetik asit, etanol, etilasetat, asetaldehit, aseton, n-propanol, 2-metil-propanol ve 2-metil-butanol bulunmaktadır. Bu tip fermentasyonda, aşırı CO₂'yi uzaklaştırmak ve gaz kabarcıklarının oluşumu ile meyvelerde oluşabilecek kırıxıklığı önlemek için havalandırma işlemi uygulanabilir. Sonuç olarak bu fermentasyonda yeşil zeytinlere göre daha fazla miktarda çözünmüş oksijen bulunmaktadır ve bu da oksidatif mayaların gelişmesinde etkindir (Lund ve diğ., 2000).

Asit konsantrasyonu %0,3-0,5 arasında değıştiğı halde, son pH 4,3-4,5 arasındadır. Bu nedenle, fermentasyonun sonunda tam bir korumanın sağlanabilmesi için, tuz konsantrasyonu %8-10'a yükseltilmelidir (Lund ve diğ., 2000).

Özay ve diğ. (1994) tarafından yapılan çalışmada, fermentasyon esnasında zeytindeki fenolik bileşiklerin yaklaşık olarak iki ay içinde salamuraya geçtiğı ve fermentasyon sonunda zeytindeki polifenol miktarının hemen hemen başlangıçtaki değerinin yarısına (%1,25) düştüğü belirtilmiştir.

2.1.5 Zeytinde bozulma

Zeytinlerin olgun veya aşırı olgun hasat edilmesi sonucunda, işlenen zeytinlerin dokuları gevşek olmaktadır. Yağ asitlerinin oksidasyonu nedeniyle oluşan yüksek asitlik, acılık ve ağır bir tat meydana getirmektedir (Aktan ve Kalkan, 2000).

Bu problemin önlenebilmesi için zeytinler, renkleri kıızıldan siyaha dönme aşamasında ve kırıxıklıklar oluşmadan hasat edilmelidir. Arzu edilen siyah renk, fermentasyon aşamasında zaman zaman verilecek hava ile sağlanabilir (Aktan ve Kalkan, 2000). Ayrıca, zeytinlerin hasat esnasında mekanik olarak zararlanmalarına dikkat edilmelidir. Bu amaçla, genellikle elle hasat tavsiye edilmektedir (Dıraman ve Arıcı, 2002).

Alkali ile muamele edilen zeytinlerde, çözünebilir bileşenlerde ve besin içeriğinde (şekerler, organik asitler, aminoasitler vb.) kayıp gibi çeşitli kimyasal ve fiziksel değişimler gözlenmektedir. Alkali işleminde, hücreler arasındaki pektin çözünür ve zeytin dokusunda yumuşama olur (Marsilio ve diğ., 1996).

Ham meyve üzerinde bulunan ve bozulma etkeni olan birçok mikroorganizma, yıkama işlemi ile uzaklaştırılmaktadır. Geri kalan mikroflora Gram negatif bakteriler, mayalar ve laktik asit bakterilerinden oluşmaktadır (Fernandez ve diğ., 1997).

Fermentasyon döneminde salamura yüzeyinde oluşan filmde, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* cinsi küfler ve maya tespit edilmiştir (Oral ve Heperkan, 1999). Zeytinde, Gram negatif basiller ve mayaların gaz kabarcığı oluşturması sonucunda balık gözü (fish eye) bozulması görülmektedir. Meyvede, et ile kabuk arasında CO₂ birikmesi sonucunda kabarcık oluşmaktadır. Meyvenin etli kısmında yumuşama ve kabuğun ayrılması ile karakterize edilmektedir (Wood, 1998; Aktan ve Kalkan, 2000).

Kabarcık oluşumunu önlemek için üretim esnasında aseptik çalışılmalı ve fermentasyon işlemine dikkat edilmelidir. Salamurada kullanılan suyun bakteriyolojik yükü kontrol edilmeli, kullanılan kap ve aletler temiz olmalı ve belirli aralıklarla temizlenmelidir. Ayrıca tuz ve salamura tankları mikrobiyal bulaşmalardan korunmalıdır. Fermentasyonda ise yararlı mikroorganizmaların gelişimini teşvik, zararlı mikroorganizmaların gelişimini ise inhibe eden ortamlar sağlanmalıdır. Burada pH kontrolü en önemli faktörlerden birisidir, pH 4,5 ve daha düşük değerlerde Gram negatif basillerin gelişimi büyük ölçüde inhibe edilmektedir (Aktan ve Kalkan, 2000).

Zapatera bozulması, zeytinlerde kötü koku oluşumu ile karakterize edilmektedir. Başlangıçta peynirimsi koku olarak tanımlanırken, sonra keskin bir kötü koku şeklinde tanımlanmaktadır. Bu bozulma, laktik asit fermentasyonunun salamura pH'ı 4,5'in altında bir değere düşmeden önce sonlanması ile gerçekleşmektedir. pH 4,5'in altında, zapatera bozulması olmamaktadır. Bozulma esnasında pH artmakta, laktik ve asetik asit metabolizmasından çeşitli bileşikler oluşmaktadır. Bu organik asitlerin arasında başta propiyonik asit olmak üzere bütirik, süksinik, formik, valerik, kaproik ve kaprilik asit yer almaktadır. Bütirik ve diğer uçucu asitler, keskin kötü kokudan sorumlu tutulmaktadır. *Propionibacterium* ve bazı *Clostridium* türleri, zapatera bozulması etkeni olarak görülmektedir. Bu bozulma asitlendirme ya da starter kültür ile inokülasyon uygulanarak önlenabilir (Wood, 1998).

Baharatlı çizik sofralık zeytinlerin raf ömrü kısadır. Konteynırlar şişebilir ve meyveler kahverengi olabilir. Çizik zeytinlerin solunumu konserveleme işleminden 48 saat sonrasına kadar devam etmektedir. İlk bozulma etkeni üretilen CO₂ olabilir. İlerleyen aşamalarda, yıkama işleminde ve ilave edilen bileşenlerin mikrobiyal yükü nedeniyle zeytinlerin mikrobiyal yükü artmaktadır. Bu durum paketteki canlı maya ve laktik asit bakteri sayısının oldukça artmasına neden olmakta, pakette şişme

gözlenebilmektedir. Bu durum özellikle fermente olabilir substrat kalıntısı varlığında ve zaman içerisinde salamura ile meyve etindeki potasyum sorbat miktarındaki azalma ile gerçekleşmektedir. Aynı zamanda renk kararmakta, titrasyon asitliği artmakta, pH ise azalmaktadır. Paketleme öncesinde çizik zeytinin ilave olarak 2 kez daha yıkanması tavsiye edilmektedir. Çünkü bu işlem ile fermente olabilir materyal ve polifenoller uzaklaştırılmaktadır. Ancak, üründe tam anlamıyla bir stabilizasyon için meyvenin solunum miktarının mümkün olduğunca azaltılması ve yüksek miktarda koruyucu madde ilavesi gerekebilmektedir (Arroyo-López ve diğ., 2009).

Zeytinlerin hasadı öncesinde zeytin sineğine karşı etkili mücadele yapılması ve hasat esnasında mekanik zararlanmaların önlenmesi, mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesinde önemlidir (Dıraman ve Arıcı, 2002).

Zeytin fermentasyonunda tuz konsantrasyonu, meyvede mevcut mikroflorayı etkilediğinden son ürünün özelliklerini etkilemektedir. Uluslar arası zeytin standardında salamura tuz konsantrasyonu %8 olarak belirtilmektedir. Geleneksel üretim tekniklerimizde ise salamura tuz konsantrasyon oranı yüksektir (%12-14). Dolayısıyla fermentasyon sonrası zeytinler tuzlu olduğundan, zeytinin karakteristik aroması maskelenmektedir. İstenilen kalitede ürün eldesi için, sürekli olarak pH kontrolünün yapılması, salamuraanın belirli aralıklarla değiştirilmesi ve alkali ile muamele gibi işlemler uygulanabilir. Ayrıca, starter kültür kullanımı da standart kalitede ürün eldesini sağlamaktadır (Özay ve diğ., 1994).

2.2. Zeytinyağı

Dünya ticaretinde yer alan yenilebilir bitkisel yağların %2'sini zeytinyağı oluşturmaktadır. Bu da dünya ticaretinin %30'una karşılık gelmektedir (Garcia ve diğ., 2005).

2.2.1 Zeytinyağının tanımı

Zeytin ağacının meyvesinden elde edilen zeytinyağı, insan vücudunda sentezlenemeyen ve biyolojik öneme sahip olan esansiyel yağ asitlerini içermesi nedeniyle sağlıklı beslenmede büyük öneme sahiptir.

2.2.2 Zeytinyağı üretimi ve ticareti

Zeytinyağının insan sağlığı üzerine faydalarının belirlenmesi ile son yıllarda üretimi ve tüketimi artmıştır.

2.2.2.1 Dünyada ve Türkiye’de zeytinyağı üretimi

Son yıllarda, Akdeniz ülkeleri haricinde Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa ülkelerinde de zeytinyağına, artan bir talebin olduğu görülmektedir (Garcia ve diğ., 2005). Çizelge 2.7’de dünya zeytinyağı üretimi verilmiştir.

Çizelge 2.7 : Dünya zeytinyağı üretimi (1000 ton) (Url-1).

Ülkeler	Yıllar								
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
İspanya	973,7	1.411,4	861,1	1.412,0	989,8	826,9	1.111,4	1.221,8	1.150,0
İtalya	509,0	656,7	634,0	685,0	879,0	636,5	490,0	470,0	560,0
Yunanistan	430,0	358,3	414,0	308,0	435,0	424,0	370,0	307,0	370,0
Tunus	130,0	35,0	72,0	280,0	130,0	220,0	160,0	170,0	160,0
Türkiye	175,0	65,0	140,0	79,0	145,0	112,0	165,0	72,0	159,0
Suriye	165,0	92,0	165,0	110,0	175,0	100,0	154,0	100,0	125,0
Fas	35,0	60,0	45,0	100,0	50,0	75,0	75,0	80,0	90,0
Portekiz	24,6	33,7	28,9	31,2	41,2	29,1	47,5	34,9	50,0
Fransa	3,2	3,6	4,7	4,6	4,7	4,4	3,3	4,7	5,5
ABD	0,5	0,5	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	2,0	2,0
Diğer	122,70	112,90	134,50	167,80	166,50	148,00	193,10	175,30	200,50
Toplam	2.565,5	2.825,5	2.495,5	3.174,0	3.013,0	2.572,5	2.767,0	2.633,0	2.866,5

İspanya, Çizelge 2.7’de görüldüğü gibi dünya zeytinyağı üretiminin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. İspanya dünya yağ üretiminin yaklaşık olarak %50 sine sahip olup, zeytinyağının yaklaşık olarak yarısı sadece bir çeşitten (Picual) elde edilmektedir. İspanya yağ üretiminin %14 ünden fazlası ise Cornicabra zeytin çeşidinden elde edilmektedir (Garcia ve diğ., 2005).

2.2.2.2 Zeytinyağı ihracatı

Dünya zeytinyağı ihracat miktarları, Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8 : Dünya zeytinyağı ihracatı (1000 ton) (Url-1).

Ülkeler	Yıllar								
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
İtalya	173,0	182,9	176,1	181,5	191,5	181,7	185,8	177,7	181,8
İspanya	88,3	112,5	107,0	114,2	110,9	99,0	124,8	133,7	125,0
Türkiye	92,0	20,0	55,5	78,0	111,5	104,5	91,0	78,5	109,0
Tunus	95,0	28,0	74,0	46,0	93,5	73,0	45,0	15,0	60,0
Portekiz	17,3	16,2	13,1	15,9	16,6	16,7	23,2	27,7	25,0
Yunanistan	10,0	10,0	15,0	10,0	10,0	10,0	12,8	9,8	10,0
Diğer	43,7	41,1	55,4	227,8	116,1	135,3	202,6	151,8	149,2
Toplam	502,0	394,5	483,0	657,5	633,5	603,5	662,0	566,5	635,0

İtalya, İspanya ve Türkiye dünya genelinde en fazla zeytinyağı ihraç eden ülkelerdir.

2.2.2.3 Zeytinyağı ithalatı

Dünya zeytinyağı ithalat miktarları Çizelge 2.9’da verilmiştir.

Çizelge 2.9 : Dünya zeytinyağı ithalatı (1000 ton) (Url-1).

Ülkeler	Yıllar								
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
ABD	200,0	193,0	191,5	226,0	221,0	232,0	250,0	246,0	250,0
İtalya	110,8	40,7	74,3	180,2	144,0	135,6	149,3	120,7	135,0
İspanya	15,8	1,6	18,2	49,4	39,2	48,0	67,9	43,4	45,0
Avustralya	30,0	26,5	31,5	31,0	28,5	29,0	41,5	27,0	35,0
Brezilya	25,0	22,5	21,0	23,5	26,5	26,0	34,5	40,0	35,0
Kanada	25,5	24,0	25,0	26,0	32,0	30,0	32,5	31,0	31,5
Japonya	29,0	31,5	30,5	32,0	32,0	30,0	30,5	29,0	29,0
Diğer	80,9	97,2	100,5	94,9	110,8	108,4	98,3	95,9	108
Toplam	517,0	437,0	492,5	663,0	634,0	639,0	704,5	633,0	668,5

Çizelge 2.9’da görüldüğü gibi ABD ve İtalya en fazla zeytinyağı ithal eden ülkelerdir. İspanya, Avustralya, Brezilya, Kanada ve Japonya’da diğer ithalatçı ülkelerdir.

2.2.2.4 Zeytinyağı tüketimi

Dünya zeytinyağı tüketim miktarları Çizelge 2.10’da verilmiştir.

Çizelge 2.10 : Dünya zeytinyağı tüketimi (1000 ton) (Url-1).

Ülkeler	Yıllar								
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
İtalya	729,0	735,0	770,0	785,0	840,0	848,2	730,0	740,0	750,0
İspanya	580,8	631,2	591,3	613,9	615,7	477,8	538,7	541,2	600,0
Yunanistan	270,0	270,0	270,0	270,0	283,0	265,0	269,5	262,7	265,0
ABD	194,5	188,5	184,0	216,5	215,5	223,0	248,0	246,0	251,0
Suriye	110,0	86,0	128,5	150,0	135,0	79,0	110,0	80,0	90,0
Fransa	92,0	95,1	97,0	94,0	97,1	99,5	101,8	103,2	106,0
Türkiye	72,5	55,0	50,0	46,0	60,0	50,0	80,0	85,0	90,0
Almanya	36,3	38,6	40,0	38,5	46,3	45,3	48,3	54,4	57,0
Fas	45,0	60,0	60,0	70,0	38,0	55,0	65,0	65,0	70,0
Diğer	460,40	447,10	486,70	598,60	592,90	547,70	607,20	600,50	596,50
Toplam	2.590,5	2.606,5	2.677,5	2.882,5	2.923,5	2.690,5	2.798,5	2.778,0	2.875,5

Çizelge 2.10’da görüldüğü gibi Türkiye zeytinyağı tüketiminde Fransa’dan sonra 7. sırada gelmektedir.

Dünya zeytinyağı üretiminin çoğu Avrupa Birliği ülkelerinde gerçekleşmektedir. En fazla üretim İspanya’da, tüketim ise Yunanistan’da (~53.4 g/kişi) olmaktadır. İspanya (~33.4 g/kişi) ve İtalya’da (~30.7 g/kişi) da tüketim miktarı fazladır (Garcia ve diğ., 2005).

2.2.3 Zeytinyağı üretimi

Yağlık zeytinler, yağ oranı en yüksek seviyeye çıktığında toplanmaktadır. Kabuğun etten kolay ayrılması, meyve parmak arasında sıkıldığında çekirdeğinin kolay ayrılması ve sap çukurundan meyve suyunun çıkması hasat zamanının göstergesidir. Yağış, fırtına, soğuk ve don zararı gibi mevsimsel şartlar nedeniyle, daha erken hasat yapılabilir (Darı, 2005).

Zeytinyağı, yağ üretimi için yetiştirilen zeytinlerden sızma, rafine ve riviera olmak üzere 3 farklı şekilde üretilmektedir. En değerlisi olan sızma zeytinyağı, zeytinden soğuk presle ayrılan ilk yağıdır. Rafine zeytinyağı, natürel zeytinyağının rafine edilmesi ile elde edilmektedir. Daha açık renkte ve kokusu daha hafiftir. Riviera tipi ise, sızma ve rafine zeytinyağının karışımıdır (Aktan ve Kalkan, 2000).

Yağ, zeytin meyvesinde mezokarp içerisinde akümüle olmaktadır. Olgun meyvelerdeki yağ içeriği genellikle %15-35 arasında değişmektedir. Yağ ekstraksiyonu için yetiştirilen zeytinler, yağ akümülasyonunun en yüksek olduğu dönemde hasat edilmektedir. Bu dönemde zeytin rengi meyve çeşidine göre değişmektedir. İspanya’da Picual, Cornicabra, Hojiblanca ve Lechin de Sevilla, İtalya’da Leccino ve Frantoio, Yunanistan’da ise Koroneiki, Megaritiki ve Tsounati yağ ekstraksiyonu için kullanılan zeytin çeşitleridir (Garcia ve diğ., 2005). Türkiye’de ise Ayvalık, Memecik, Memeli, Erkence, Sarı Haşebi, Saurani, Halhalı, Kalem Bezi, Kilis Yağlık, Nizip Yağlık ve Yağ Çelebi yağlık zeytin çeşitleridir (Saygın Gümüşkesen ve Yemişçiöğlü, 2007).

Son ürünün kalitesi ve fiyatında meyvenin hasadı etkilidir. Zeytinlerin elle toplanması iş gücü gerektirmekte olup, pahalıdır. Ancak uygun olgunluktaki sağlıklı meyvelerin toplanması nedeniyle iyi kalitede yağ elde edilmektedir. Bu işlemin dezavantajı fiyatının yüksek olmasıdır. İşçilik masrafı, yağ üretim masrafının %50-80’ini oluşturmaktadır. Mekanik hasat, silkeleyici bir ekipman ile gerçekleştirilebilir, fakat bu eski bahçelere adapte edilemeyebilir. Yağ ekstraksiyonu ideal olarak hasattan sonra 24-48 saat içerisinde gerçekleştirilmelidir. Aksi halde, meyvede bozulmayı önlemek için kontrollü koşullar altında depolanma yapılması gerekmektedir (Garcia ve diğ., 2005). Yağlık zeytin uygun şekilde depolanmadığı takdirde, hidrolitik ve oksidatif reaksiyonlar nedeniyle yağın kalitesinde kayıp olmaktadır (Boskou, 2009).

Hasar görmüş meyveden elde edilen yağda; yüksek asitlik, bozuk tat ve düşük stabilite mevcuttur ve sonuçta rafinasyon işleminin uygulanması gerekmektedir (Garcia ve diğ., 2005).

Zeytinyağı endüstrisinde, yağın kalitesinin, stabilitesinin ve besinsel özelliklerinin korunmasına önem verilmektedir. Zeytinyağı ekstraksiyonunda presleme, santrifüjleme ve sızdırma işlemleri uygulanmaktadır (Boskou, 2009).

2.2.3.1 Yağ ekstraksiyonu

Yağ ekstraksiyonu mekanik araçlar ile gerçekleştirilmektedir ve bir dizi operasyon gerektirmektedir. İlk olarak yağ içeren dokuların parçalanması amacıyla zeytinler ezilir. Zeytinlerin ezilmesinde geleneksel olarak taş değirmenler kullanılmaktadır. Elde edilen zeytin ezmesi yağ ekstraksiyonu öncesinde yavaşça ve sürekli olarak

kariştırılır. Bu aşama büyük yağ damlalarının oluşmasına yardım eder, açığa çıkan yağ miktarı arttırılmış olur. Mekanik kırıılar kullanılarak da ezme işlemi gerçekleştirilebilir. Ancak bu işlemdede uygulanan g, eski taş değirmenden daha kuvvetlidir ve bu durum emülsiyon oluşumuna neden olabilir. Emülsiyonu yıkmak için daha uzun kariştırma süresine ihtiyaç duyulmaktadır. Daha da önemlisi mekanik kırıılar kullanıldığında zeytin ezmesinin sıcaklığı taş değirmendekinden daha fazla artabilmektedir (Garcia ve diğ., 2005).

Yağın zeytin ezmesinden ayrılması; basınçlı sistem kullanılarak, seçici filtrasyon (sızma), santrifüj ya da bu metotların kombinasyonu ile gerçekleştirilebilir. Basınçlı sistemler yağ ekstraksiyonunda kullanılan en eski metot olup hala kullanılmaktadır. Geleneksel olarak, taş ile ezme işlemi sonrasında basınçlı sistemler uygulanmaktadır. Bu işlem devam eden bir sistem olmayıp, düşük kapasitelidir. Santrifüj devam eden bir sistemdir ve bazen sızma ile birlikte kullanılmaktadır (Garcia ve diğ., 2005).

Sızdırma yöntemi ile yağ eldesi, oda sıcaklığında ve su ilave edilmeden gerçekleştirildiğinden en iyi sistemdir. Fenolik bileşenlerde kayıp çok azdır. Bu sistem, tam bir ekstraksiyon sağlamadığından, santrifüj ile kombine halde kullanılması gerekmektedir (Boskou, 2009).

Günümüzde, 3-faz ve 2-faz olmak üzere iki çeşit santrifüj sistemi kullanılmaktadır (Boskou, 2009). Bazı santrifüj sistemlerinde (-fazlı dekanter) akıcılığı ve yağ ayırımını arttırmak için zeytin ezmesine ılık su (20-30°C) ilavesi gerekmektedir. İlave edilen su miktarı, yağ miktarını ve fenolik bileşen içeriğini etkilemektedir. Fenolik bileşenlerde atık su ile kayıp olabilmektedir. Basınçlı sistemde ve üç-fazlı santrifüj sisteminde fazla miktarda atık su oluşmaktadır. Bu da evre kirliliği oluşturmaktadır. Ancak yeni santrifüj sistemleri (iki-fazlı dekanter) su ilave edilmeksizin kullanılabilmektedir. Ticari olarak, zeytinde bulunan yağın %80-90'ı çıkarılabilmektedir. Yağ ekstraksiyonu sonrası elde edilen kalıntı (posa), posa yağı ekstraksiyonu için kullanılır. Bu işlem solventler ile gerçekleştirilir (Garcia ve diğ., 2005). Her iki sistemde de iyi kalitede yağ elde edilmektedir. Fakat, iki-fazlı sistemde su ilave edilmediğinden, yağın fenol içeriği daha yüksektir (Boskou, 2009).

2.2.3.2 Yağın bileşimi

Sızma zeytinyağının yaklaşık olarak %98-99'u esas olarak triailgliserolden (tryacylglycerol) oluşmaktadır. Zeytinyağındaki asıl yağ asitleri; oleik (C18:1),

palmitik (C16:0), linoleik (C18:2), stearik (C18:0) ve palmitoleik (C18:1) asitlerdir. Yağ asidi profili çeşide ve çevresel faktörlere bağlıdır. Zeytinyağı bileşiminin %0,5-1,5 gibi küçük miktarı gliseridik olmayan yapıdadır. Bu yapı 230 dan fazla bileşen içermektedir. Bunlar arasında; tokoferoller (özellikle α -tokoferol), fenolik bileşenler, pigmentler, skualen, steroller ve triterpenik alkoller yer almaktadır (Garcia ve diğ., 2005).

Sızma zeytinyağının rengi, yağ ekstraksiyonu için kullanılan zeytinlerin olgunluk aşamasına bağlıdır. Yağ rengi, zeytin çeşidi ve olgunluğu, yetiştirme koşulları, yağ elde etme işlemleri ve depolama koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Sızma zeytinyağının rengi, karotenoidlerin ve klorofillerin mevcudiyeti nedeniyle yeşilden yeşil-sarıya, altın-sarısına kadar değişmektedir (Garcia ve diğ., 2005).

Yeni üretilmiş zeytinyağındaki partiküller tam olarak çökene kadar zeytinyağı bulanık görünümündedir. Bazı tüketiciler, daha natürel olduğunu düşündüklerinden bu görünümdeki yağları tercih etmektedir. Bulanık görünüm birkaç ay kalabilmektedir. Yağ, mikro-emülsiyon/süspansiyon sistemidir. Su mikro-damlacıkları 1-5 μ m boyutundadır. Bulanıklık, düşük su içeriğinin olması ve yağ içerisindeki doğal emülsifiyerlerin mevcudiyetinden kaynaklanmaktadır. Zeytin meyvesinden gelen katı partiküller (5-60 μ m) tarafından süspansiyon oluşturulmaktadır (Koidis ve diğ., 2008).

Beş farklı çeşit İspanyol zeytininden elde edilen zeytinyağı örneklerinde toplam 17 pigment belirlenmiştir. Feofitin (6,3-21,7 mg/kg) ve lutein (1,78-9,34 mg/kg) en baskın olanlarıdır. Diğer pigmentler ise; klorofil a ve b, feofitin a, β -karoten, neoksantin, anthera ksantin, luteoksantin, violaksantin ve mutatoksentindir. İspanya'da Cornicabra çeşidi zeytinden ticari olarak elde edilen virjin zeytinyağında klorofil miktarı 1,7-27,1 mg/kg ve karotenoidlerin miktarı ise 2,3-14 mg/kg arasındadır. Ancak, elle hasat edilen optimum olgunluk safhasındaki zeytinlerden elde edilen sızma zeytinyağında klorofil içeriği 1,3-82,6 mg/kg ve karotenoidler ise 2,1-31,5 mg/kg arasında değişmektedir (Garcia ve diğ., 2005).

Zeytinyağında bulunan fenolik bileşenlerin miktarı ve çeşidi; elde edildiği zeytinin yetiştirildiği bölge, zeytin ağacının yaşı, zeytinin olgunluğu, hasat zamanı, işleme tekniği ve depolama süresi gibi faktörlere bağlıdır (Cicerale ve diğ., 2009). Fenolik bileşenlerin konsantrasyonu, olgunlaşma esnasında yavaş yavaş maksimum seviyeye

ulaşmakta ve sonrasında hızla azalmaktadır. En düşük fenolik içerik, zeytin renginin siyah olduğu aşamadır (Boskou, 2009).

Fenolik bileşenler, oksidasyona karşı zeytinyağı stabilitesi üzerine etkisinin yanı sıra zeytinyağı ve sofralık zeytinin duyusal karakteristiğini etkilemektedir. Zeytinde bulunan fenolik bileşenler; fenolik asitler, fenolik alkoller, secoiridoidler flavonoidler, anthosiyaninler, oleuropein, demethyloleuropein, ligstroside ve nüzhenidedir (Cicerale ve diğ., 2009). Oleuropein ve demethyloleuropein zeytinin et kısmında yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (Garcia ve diğ., 2005).

Oleuropein, sadece Oleaceae cinsinde bulunan karakteristik bir fenolik bileşendir. Zeytine karakteristik acı tadını vermektedir. Olgunlaşmamış meyvede konsantrasyonu yüksektir. Ancak olgunlaşma esnasında endojen enzimler ile hidrolize uğrayarak miktarı azalmaktadır (Garcia ve diğ., 2005).

Sızma zeytinyağı karakteristik yağ asidi profili ve antioksidan aktivitesi nedeniyle oksidasyona karşı yüksek stabiliteye sahiptir (Garcia ve diğ., 2005).

Fenoller ve tokofenoller, sızma zeytinyağı stabilitesinde önemlidir. Fenollerin antioksidan aktivitesinin, tokoferol mevcudiyetinde arttığı belirtilmiştir (Boskou, 2009).

2.2.3.3 Yağın kalitesi

Zeytinyağı için ticari standartlar, Uluslararası Zeytinyağı Konsey'i (International Olive Oil Council, IOOC) tarafından belirlenmiştir. Duyusal değerlendirmelerin yanı sıra kimyasal testlerde dikkate alınmaktadır. Asitlik, yağda bulunan serbest oleik asit miktarı olarak ifade edilmekte olup, yağın hidrolizinin (bozulmasının) ölçümüdür. Titre edilebilir asitlik, olgunlaşmanın ileri safhasında (meyvenin yumuşayıp, patojenlere hassas hale geldiği aşama) artmaktadır. Bozulmuş zeytin içeren yığından elde edilen zeytinyağında, uygun olmayan koşullar altında uzun süre depolanan çiğ materyalde bulunan mikrobiyal kaynaklı lipazların etkisi nedeniyle yüksek asitlik gözlenmektedir (Garcia ve diğ., 2005).

Tüketim öncesi rafinasyon işlemi uygulanan diğer bitkisel yağların tersine, sızma zeytinyağı işlenmeksizin doğrudan tüketilmektedir ve karakteristik aromaya sahiptir. Zeytinyağı aroması, uçucu bileşenlerin ve fenolik bileşenlerin kompleks karışımının bir ürünüdür. Zeytin çeşidi, yetiştiği bölge, hasatta kullanılan metot ve zeytinin

olgunlaşma safhası zeytinyağının aromasını etkilemektedir. Zeytinyağı uçucu bileşenlerinin çoğu, ezme ve karıştırma işlemleri esnasında parçalanmış dokular üzerinde lipoksigenaz yolu ile linoleik ve linolenik hidroperoksitlerden oluşturulmaktadır. Aldehit, keton, hidrokarbon ve ester gibi birçok 6 karbonlu uçucu bileşen oluşmaktadır (Garcia ve diğ., 2005).

Malaksasyon işlemi esnasında, zeytin ezmesi havaya maruz kaldığında, oksidasyon enzimleri ile aglikonların oksidasyonu gerçekleşmektedir. Bu aşamada zeytin ezmesini oksidasyondan korumak için inert gaz (azot) ile çalışabilen makinaların kullanılabileceği belirtilmektedir (Sánchez-Ortiz ve diğ., 2008; Boskou, 2009).

Boselli ve diğ. (2009) tarafından yapılan çalışmada, üç farklı malaksasyon sıcaklığının (25, 35 ve 45°C) sızma zeytinyağının kalitesi üzerine etkisi incelenmiştir. 45°C de elde edilen sızma zeytinyağlarında yanık tat oluşmuştur. 25 ve 35°C sıcaklıklar arasında oksidatif stabilite ya da duyuşsal kalitede önemli bir farklılık gözlenmezken, 35°C de elde edilen yağ panelistler tarafından en kaliteli olarak belirlenmiştir.

Ayrıca yoğurma işlemi öncesinde çekirdeği çıkarılan zeytinlerden elde edilen natürel zeytinyağının duyuşsal özelliklerinin daha iyi olduğu, raf ömrünün uzun olduğu ve minör bileşenler bakımından daha zengin olduğu belirtilmiştir. Zeytin çekirdeği ile birlikte yağa işlendiğinde, çekirdekten gelebilecek enzimler hamurun bileşimini olumsuz yönde etkilemektedir. Lipoksigenaz enzimi, oksidatif reaksiyonların gerçekleşmesine neden olmaktadır (Yorulmaz ve diğ., 2009).

Farklı ekstraksiyon sistemleri, son ürünün kalitatif karakteristiğini etkileyebilir. Koroneiki çeşidi zeytinden elde edilen yağda toplam fenolik bileşen miktarı üç-fazlı sistemde 293 ppm iken iki-fazlı sistemde 483 ppm dir. Coratina çeşidinde ekstrakte edilen fenolik bileşenler ise üç-fazlı sistemde 861 ppm iken iki-fazlı sistemde 1168 ppm dir (Garcia ve diğ., 2005).

2.3 Küf Gelişimi ve Mikotoksin Oluşumu

Mikroorganizmalar, tarımsal ürünlerde ve çeşitli gıda maddelerinde doğal flora olarak bulunmaktadır. Ancak gelişmeleri için uygun olan koşullarda, gıdalarda bozulmaya ve ürettikleri toksik metabolitlerle insan ve hayvanlarda hastalıklara neden olmaktadır (Taydaş ve Aşkın, 1995; Karadeniz ve Ekşi, 2002).

Küfler tarafından canlı bir dokunun istilasına "mikozis", oluşturulan sekonder metabolite "mikotoksin" ve bu mikotoksinlerin neden olduğu hastalıklara ise "mikotoksikoz" adı verilmektedir (Taydaş ve Aşkın, 1995; Karadeniz ve Ekşi, 2002; Basmacıoğlu ve Ergül, 2003). Mikotoksinler; teratojenite, karsinojenite ve bağışıklık sisteminin zayıflamasına neden olmaktadır (Wijnands ve Leusden, 2000).

İnsanların gıda zincirinde bulunan mikotoksijenik küfler daha çok *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* türleridir (El Adlouni ve diğ., 2006; Roussos ve diğ., 2006). Ürünlere küf kontaminasyonu tarlada, hasat sonrasında ya da depolama esnasında olabilmektedir (Robinson, 2000). Bu küfler, sıcaklık ve nem gibi uygun koşulların mevcudiyetinde gıdalarda gelişerek, mikotoksin üretebilmektedir (El Adlouni ve diğ., 2006).

Gıdalarda mikotoksinlerin mevcudiyeti; toksik etkileri ve yüksek termal stabiliteleri nedeniyle insanlar ve hayvanlar için potansiyel tehliktir. Aflatoksinler, okratoksin, patulin, fumonisin, deoksinivalenol ve zearalenon gıdalarda bulunabilen önemli mikotoksinlerdir (Roussos ve diğ., 2006).

Mikotoksinler üzerine çalışmalar, 1960'lı yıllarda en toksik metabolit olarak bilinen aflatoksinlerin bulunması ile başlamıştır (Taydaş ve Aşkın, 1995; Robinson, 2000). Daha sonra patulin, okratoksinler, penisillik asit, sitrinin, sterigmatosistin, zearalenon ve alternaria toksini olmak üzere birçok mikotoksin üzerine araştırmalar yapılmıştır (Karadeniz ve Ekşi, 2002). Gıdalarda µg/kg ve mg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda bulunabilmektedirler.

Mikotoksinler küfler tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı kompleks organik bileşikler olup (Robinson, 2000; Weidenböner, 2001; Klich ve diğ., 2009), omurgalılara karşı toksik etki göstermektedir (Robinson, 2000; Klich ve diğ., 2009).

Mikotoksin oluşumu, logaritmik fazın sonunda ya da duraklama fazının başlangıcında olmaktadır. Kumarin, steroid gibi farklı kimyasal gruplarda bulunabilirler (Weidenböner, 2001).

Küfler tarafından üretilen birincil metabolitler, gelişim için esansiyeldir. Sekonder metabolitler ise hücre materyallerinin sentezi ve mikroorganizmaların gelişimi ile direkt bağlantılı olmadığından, küfler bu metabolitlere ihtiyaç duymazlar (Robinson, 2000; Klich ve diğ., 2009).

Gıdalarda küf gelişiminin olması, daima mikotoksin oluşumu ile sonuçlanmamaktadır. Aynı şekilde görsel olarak küf gelişiminin olmaması, mikotoksinlerin oluşmadığı anlamına gelmez (Vries, 1997). Ayrıca, bir küf türü içerisindeki tüm izolatlar, karakteristik toksini üretmeyebilir. Örneğin, *A. flavus* suşlarının yaklaşık olarak sadece %40'ı aflatoksin oluşturmaktadır (Klich ve diğ., 2009).

Mikotoksinler, önemli ekonomik kayıpların yanı sıra insan ve hayvan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır (Robinson, 2000). Düşük kalitede yem tüketimi nedeni ile hayvanlar, insanlara göre mikotoksine daha fazla maruz kalmaktadır (Weidenbörner, 2001).

Mikotoksinlerin toksik etkileri, akut ve kronik olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Akut etkiler, sıklıkla ölümcül hastalıkları içermektedir. Kronik etkiler ise kilo kaybı, bağışıklık sisteminde zayıflama, kanser, süt hayvanlarında süt üretiminde azalma olarak belirtilmektedir (Robinson, 2000; Basmacıoğlu ve Ergül, 2003).

Mikotoksinlerin, insan ve hayvanlarda toksik rahatsızlıklara neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Ancak küfler, gıdalar ve hastalıklar arasında bir bağlantı olduğu son yıllarda üzerinde önemle durulan bir konudur. Mikotoksinlerden kaynaklanan hastalıkların minimize edilebilmesi için, gıdaların mikotoksin içerikleri üzerine uygun düzenlemelerin yapılması gerekmektedir (Begum ve Samajpati, 2000).

Mikrofungi, en iyi hafif asidik, pH 5,5-6,5 değerinde gelişebilme eğilimindedir. Hem aflatoksin hem de okratoksin, asidik koşullarda optimum şekilde sentezlenmektedir. Düşük pH ve yüksek şeker konsantrasyonu, *Aspergilli* gelişimini arttırmaktadır (Klich ve diğ., 2009).

Küf sporları; toprak, su bitkileri, sebzeler ve çürüten diğer organik materyallerde bulunmakta ve bunlar aracılığıyla da havaya taşınmaktadır. Cvetnić ve Pepeljnjak (1997) tarafından, hava kaynaklı küflerin %34,4'ünün *Penicillium* ve %21,6'sının *Aspergillus* türlerine ait olduğu belirlenmiştir. İzole edilen *Aspergillus* türlerinin toksijenik potansiyeli incelendiğinde, *A. flavus* tarafından aflatoksin B₁ (0,3 mg/kg) oluşumu belirlenmiştir.

Mikron boyutunda olan küf sporları inhalasyon yolu ile akciğer ve kan arasında oksijen alış-verişinin olduğu alveollere kadar solunabilmekte ve toksin içeren bu

sporlar kana karışabilmektedir. Ancak henüz bu ajanların insan vücudunda bulunduğunu gösteren biyolojik bir marker mevcut değildir (Yoltaş ve Haliki-Uztan, 2008). Küflerin insanlarda kronik bronşit, astım, fungal allerji, pnömoniye aşırı hassasiyet ve aspergillozis gibi çeşitli hastalıklara neden olabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle dünyada sadece depolanan tohum, hububat ve gıdalardaki bozulmalar değil, aynı zamanda hava kaynaklı küf sporları ile bitki, hayvan ve insan hastalıkları arasında ilişki olup olmadığı da dikkat çekmektedir (Cvetnić ve Pepelnjak, 1997).

2.3.1 Mikotoksin oluşumunda etkili faktörler

Gıdalarda küflerin gelişimi ve mikotoksin üretiminde; nem, su aktivitesi (a_w), sıcaklık, substrat bileşimi, pH, rekabetçi küf ve mikroorganizma gelişimi (Kapetanakou ve diğ., 2009; Mateo ve diğ., 2009; Selouane ve diğ., 2009) ve bitki üzerindeki stres (kuraklık, mekanik hasat ekipmanlarının, böcek ve dolunun tohumda neden olduğu zarar) etkilidir (Robinson, 2000; Pardo ve diğ., 2006a).

Gıdalarda mikotoksin mevcudiyetinin kontrolünde en etkin strateji, mikotoksin oluşturan küf gelişiminin önlenmesidir. Bu amaçla, küf enfeksiyonunu ve mikotoksin sentezini etkileyen farklı eko-fizyolojik faktörlerin kritik limitlerinin bilinmesi çok önemlidir (Bellí ve diğ., 2006a; Pardo ve diğ., 2006a). Çimlenme, gelişim ve sporlanma üzerinde etkili en önemli faktörler; su aktivitesi (a_w), sıcaklık (Mitchell ve diğ., 2004) ve substrat bileşimidir (Comerio ve diğ., 1998; Abramson ve diğ., 1999). Bu parametrelerin küf gelişimi ve toksin birikimi üzerine etkisinin bilinmesi, bozulma ve bulaşmaların önlenmesi için faydalı olabilir. +4°C nin altındaki sıcaklık değerlerinde mikotoksin oluşumunun önlenileceği belirtilmektedir (Weidenbörner, 2001).

Her küf türü, gelişmesi için farklı minimum su aktivitesi (a_w) değerine ihtiyaç duymaktadır. Mikotoksin oluşumunda da su aktivitesi (a_w) değeri etkilidir. Artan nem içeriği ve su aktivitesine (a_w) bağlı olarak mikotoksin oluşumu artmaktadır.

Tahıllarda %20-25 arasında nem içeriği bulunduğunda mikotoksin oluşumu maksimum miktarda olmaktadır. Bu nedenle nem miktarının; tahıllarda %13'ten az, yüksek yağ içerikli tohumlarda ise %7'den az olması gerektiği belirtilmiştir (Weidenbörner, 2001).

Yem üretiminde hasattan depolama safhasına kadarki süreçte mikrobiyal bulaşma gerçekleşebilmektedir. Yemlerin kalitesinin önemi sadece hayvanlar için değil, aynı

zamanda hayvanlardan elde edilen ürünleri tüketen insanlar içinde geçerlidir. Depolanan yemlerin nem içeriğinin %13-14'ün üzerinde olması ve depolanan ortamın neminin %75'in üzerinde olması mikrobiyal bozulmaları arttırmaktadır (Basmacıoğlu ve Ergül, 2003).

Küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu, düşük O₂ konsantrasyonu (< %1) ve yüksek konsantrasyonlarda CO₂ ile inhibe edilmektedir. Yüksek konsantrasyonlu CO₂'nin, yüksek konsantrasyonda N₂ ve düşük konsantrasyonda O₂ uygulamasından daha etkili olduğu belirlenmiştir. Özel gaz kompozisyonlarına toleransı, sıcaklık ve su aktivitesi (a_w) etkilemektedir (Weidenbörner, 2001).

Mikotoksin oluşumunu; karbonhidratlar (glukoz, sakkaroz vb.), belli aminoasitler (asparagin, glycin vb.) ve yağ asitleri arttırmaktadır. Bitkisel ürünler yüksek karbonhidrat içerikleri nedeniyle mikotoksin kontaminasyonunda hayvansal ürünlere göre daha büyük risk taşımaktadır. Hayvansal ürünlerden ise özellikle süt riskli gruptadır (Weidenbörner, 2001).

2.3.2 Mikotoksinler ile ilgili yasal limitler

Gıdaların mikotoksin seviyelerine ilişkin ulusal, yerel ya da uluslararası standartlar/düzenlemeler ile tüketicilerin korunması sağlanmalıdır. Avrupa'da gıda ve yemlerde mikotoksin seviyelerine ilişkin düzenleme Avrupa Toplulukları Komisyonu (European Community Commission, CEC) tarafından gerçekleştirilmektedir (Selouane ve diğ., 2009).

Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde aflatoksinler için belirtilen kabul edilebilir en yüksek değerler Çizelge 2.11'de verilmiştir.

Çizelge 2.11 : Maksimum aflatoksin limitleri (TGK, 2009).

Gıda Maddesi	Maksimum limitler (µg/kg)	
	B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂
Aflatoksin		
Fındık, antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yerfıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	-	10,0
Yerfıstığı (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0	15,0
Tahıllar [karabuğday (<i>Fagopyrum sp.</i>) dahil] ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan tüketilen veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2,0	4,0
Mısır (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0
Baharatların aşağıdaki türleri için; - Kırmızıbiber (<i>Capsicum spp.</i>) (bunların kurutulmuş meyveleri, kırmızıbiber ve acı kırmızıbiberin bütün ve toz hali dahil) - 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>)	5,0	10,0
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	-
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	-
Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	5,0	10,0

Sağlıklı insanların kan serumunda mikotoksinlerden özellikle OTA sıklıkla tespit edilmektedir. Bu durum kontamine gıdaların sürekli olarak tüketilmesine bağlanmaktadır. Kontaminasyon düzeyi çok düşük olsa dahi, OTA'nın varlığı halk sağlığı için tehlike oluşturmaktadır (Selouane ve diğ., 2009).

Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde okratoksin A için belirtilen kabul edilebilir en yüksek değerler Çizelge 2.12'de verilmiştir.

Çizelge 2.12 : Maksimum okratoksin A (OTA) limitleri (TGK, 2009).

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)
Okratoksin A	
İşlenmemiş tahıllar	5,0
Tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan tüketime sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3,0
Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm dahil)	10,0
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,0
Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve	10,0
Şarap (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az % 15 olan şaraplar hariç) ve meyve şarapları	2,0
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli	2,0
Üzüm suyu, üzüm suyu konsantresi, üzüm nektarı ile doğrudan tüketime sunulan üzüm şırası ve üzüm şırası konsantresi	2,0
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,5
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,5
Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	10,0

2.3.3 Zeytinde küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu

Özellikle *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri başta olmak üzere birçok küf türü zeytinde gelişebilmekte ve hasat sonrası depolama safhasında zeytinde toksin oluşumu ve bozulmaya neden olabilmektedir (El Adlouni ve diğ., 2006). Zeytinlerde küf gelişimi, küfün meyve eti içerisine girişi ile başlamakta, bunu misel gelişimi ve mikotoksin oluşumu takip etmektedir (Weidenböner, 2001).

Salamura siyah zeytinde yapılan bir diğer çalışmada, başta *Penicillium aurantiogriseum*, *P. camambertii*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. funiculosum*, *P. glandicola*, *P. griseofulvum*, *P. islandicum*, *P. oxalicum*, *P. roquefortii*, *P. verrucosum* ve *P. viridicatum* olmak üzere toplam 63 küf suşu izole edilmiştir (Meriç ve Heperkan, 2001).

Siyah zeytinde mikotoksinlerden; sitrinin, penisillik asit, aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂, okratoksin A, sterigmatosistin ve patulin tespit edilmiştir (Oral ve Heperkan, 1999).

Ayrıca *altenuene*, *alternariol*, *alternariol metil eter* ve *tenuazonik asit* mevcudiyeti belirtilmektedir (Weidenbörner, 2001; Bottalico ve Logrieco., 2008).

Fas'ta üretilen Grek tipi siyah zeytinlerden 17 küf türü izole edilmiştir. Bu izolatların 8 tanesi *Aspergillus flavus*, 7 tanesi *Aspergillus petrakii* ve 2 tanesi *Aspergillus ochraceus* olarak tanımlanmıştır. Zeytin ezmesinde *A. flavus* türleri tarafından aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ oluşumu ve *A. ochraceus* ile *A. petrakii* türleri tarafından okratoksin, penisillik asit, patulin ve sitrinin oluşumu incelenmiştir. Çalışmada aflatoksin, okratoksin, patulin ve sitrinin'in oluşturulmadığı belirlenmiştir (Gourama ve Bullerman, 1988).

Mısır'da üretilen sofralık siyah zeytinlerden izole edilen dokuz *A. flavus* ve beş *A. parasiticus* türünün besiyeri ortamı ve zeytin ezmesinde aflatoksin B₁ oluşturduğu belirlenmiştir (Yassa ve diğ., 1994).

Salamura sofralık siyah zeytinden izole edilen 5 adet *Aspergillus flavus* ve 2 adet *Aspergillus parasiticus* türünün gelişimi ve aflatoksin oluşumunun incelendiği çalışmada hasarsız siyah zeytin, hasarlı siyah zeytin ve siyah zeytin ezmesi kullanılmıştır. Karşılaştırma için *Aspergillus flavus* NRRL 6555 ve *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 türleri kullanılmıştır. Tüm aflatoksijenik türler, hasarlı siyah zeytin ve siyah zeytin ezmesi üzerine inoküle edildiğinde yoğun bir şekilde gelişmiş, fakat hasarsız siyah zeytinde gelişim zayıf olmuştur. Kuvvetli aflatoksijenik türler, incelenen tüm örneklerde düşük miktarda aflatoksin oluşturmuştur. Zayıf aflatoksijenik türler ise tayin edilebilir miktarda aflatoksin oluşturmamıştır (Eltem, 1996).

Zeytin ezmesi mikroflorası ve yağ asitliği üzerine zeytin sineği hasarı, depolama, hasat zamanı ve zeytinin yetiştiği arazi koşullarının etkisinin incelendiği çalışmada, araştırılan faktörler arasında bazı interaksiyonlarda belirlenmiştir. Zeytin sineği hasarı ve depolama koşulları sinerjistik etki göstererek yağ asitliğini arttırmıştır. Yağ asitliği, mikroflora popülasyonuna önemli bir şekilde bağlı olmamasına rağmen, zeytin sineği hasarı ve yağ asitliği arasındaki ilişki lineer olarak belirlenmiştir (Torres-Villa ve diğ., 2003).

2002-2003 yıllarında Sicilya'da üretilen 28 sızma zeytinyağı ile yeşil ve siyah zeytinden oluşan toplam 45 adet örnekte yapılan çalışmada aflatoksinler ve okratoksin A varlığı incelenmiştir. Zeytinyağlarının %46'sında ve zeytinlerin ise

%67'sinde bu mikotoksinler belirlenmiştir. Mikotoksin belirlenen zeytinyağlarda 6-40 ng/kg aflatoksin ve 52-244 ng/kg OTA; zeytinlerde ise 31-1518 ng/kg aflatoksin ve 101-8391 ng/kg OTA tespit edilmiştir. Sadece 1 zeytinyağı ve 6 zeytin örneğinin, aflatoksin ve okratoksin A'yı birarada içerdiği bildirilmiştir (Finoli ve diğ., 2005).

Fas'ta perakende satış yerinden ve süpermarketten alınan 10 zeytin örneğinde OTA ve aflatoksin B₁ içeriği incelenmiştir. Tüm zeytin örneklerinin <1,02 µg/kg düzeyinde OTA ve 0,5 µg/kg ın üzerinde aflatoksin B₁ içerdiği belirlenmiştir. Bu toksinlerin bir arada mevcudiyeti toksik riski arttırmaktadır. Zeytin çeşitleri arasında özellikle 'Greek stili' siyah zeytinlerin, toksijenik küfler tarafından kontaminasyonu daha fazla olduğu belirtilmektedir (El Adlouni ve diğ., 2006).

Yapılan bir çalışmada tuz ilavesinin mikrofloraya etkisi incelenmiştir. Başlangıç mikroflorası 4,1 log₁₀ cfu/g laktik asit bakterisi, 3,7 log₁₀ cfu/g enterobacteria ve 4,0 log₁₀ cfu/g pseudomonads olan zeytine kuru tuzlama işlemi uygulanmıştır. Kuru tuzlama sonrasında üründeki düşük su aktivitesi nedeniyle maya haricinde herhangi bir mikrobiyal grup belirlenmemiştir. Düşük su aktivitesi/yüksek tuz içeriğinin bu mikroorganizmaların gelişimi için uygun olmadığı ve 4°C de depolama süresince maya popülasyonunun sürekli olarak azaldığı belirtilmiştir. 20°C de maya gelişimini baskılamada yalnızca potasyum sorbat uygulamasının etkili olduğu bildirilmiştir (Panagou, 2006).

2003 ve 2004 yıllarında Fas'ta zeytinyağı üretimi esnasında, bozulmuş zeytin ve zeytin küspesinden oluşan toplam 136 örnek analiz edilmiştir. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Humicola* ve *Ulocladium* cinslerine ait toplam 285 tür izole edilmiştir. Belirlenen izolatların önemli bir kısmının *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerine ait olduğu ve sırasıyla toplam izolatin %32,3 ve %26,9'unu oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışmada izole edilen tüm *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger* türlerinin aflatoksin ve OTA oluşturma kapasiteleri nişasta bazlı besiyeri ortamında (starch-based culture media) incelenmiştir. Zeytin ve zeytin küspesinden izole edilmiş 9 adet *A. flavus* türünün 7 adedi 48-95 µg/kg konsantrasyonunda aflatoksin B₁, 36 adet *A. niger* türünden 27 adedinin ise OTA oluşturduğu belirlenmiştir (Roussos ve diğ., 2006).

Güney İtalya’da toplanan zeytinde alternariol (AOH), alternariol metil ester (AME), altenuene (ALT), altertoksin-I (ATX-I) ve tenuazonik asit (TA) gibi *Alternaria* mikotoksinlerinin mevcudiyeti üzerine yapılan tarama çalışmasında 13 zeytin örneğinin 9 adedinin *Alternaria* ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Bottalico ve Logrieco, 2008).

Zeytin dokusunda bulunan fenolik ekstraktlar, kafeik asit içermektedir. Az miktarda da kateşin ve kumarin bulunmaktadır. Bu fenolik bileşenlerin *A. flavus* gelişimini inhibe etmeksizin aflatoksin oluşumunda %90 oranında inhibisyon sağladığı belirtilmektedir (Nychas, 1995). Samapundo ve diğ. (2007) tarafından da, kafeik asitin *A. flavus* ve *A. parasiticus* gelişimini engellemediği, ancak bu küfler tarafından aflatoksin B₁ oluşumunda önemli bir azalma sağladığı bildirilmiştir.

Zeytinde küf florası ve mikotoksin varlığı ile ilgili yapılan çalışmalarda, hasat sonrası muhafaza şartlarının kontrol altında tutulmasının önemine dikkat çekilmektedir.

2.3.4 Zeytinyağında mikroflora

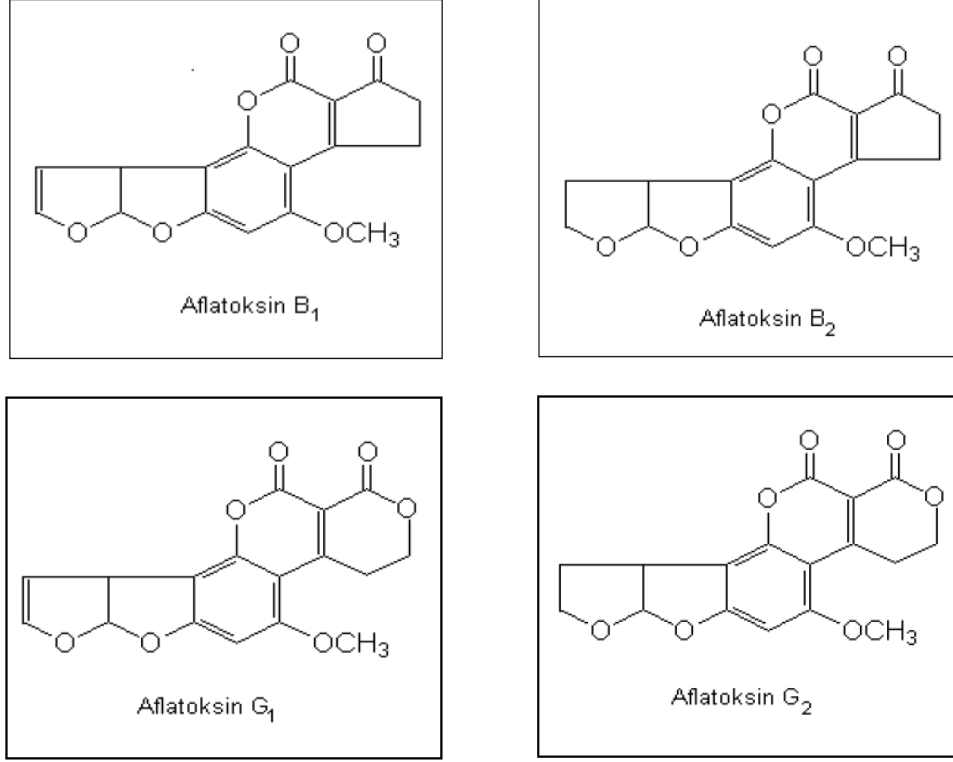
Yeni üretilmiş zeytinyağının %0,17-0,49 oranında su içerdiği ve farklı tipteki (bakteri, maya, küf) mikroorganizmaların canlı kaldığı bildirilmiştir. Zeytinyağında belirlenen mikroorganizmalar, zeytin mikroflorasından kaynaklanmakta olup çok düşük konsantrasyondadır (<3 log cfu/mL yağ). Düşük konsantrasyondaki bu mikroorganizmaların enzim aktivitesinin son ürün kalitesini etkilemediği belirtilmektedir (Koidis ve diğ., 2008).

Zeytinden izole edilen *Geotrichum*, *Mucor* ve *Rhizopus* türlerinin toksijenik olmadığı, ancak lipaz üreterek asitliği arttırdığı ve zeytinyağı kalitesinde kayıplara neden olduğu bildirilmektedir (Roussos ve diğ., 2006).

2.4 Aflatoksinler

Aflatoksinler, *Aspergillus* türleri (özellikle *A. flavus* and *A. parasiticus*) tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir (Leontopoulos ve diğ., 2003; Ghitakou ve diğ., 2006). Karsinojen, teratojen, genotoksik ve mutajen ajan olarak belirtilmektedir (Ghitakou ve diğ., 2006).

Aflatoksinler, difurokumarosiklopentenon ve difurokumarolakton gruplarında sınıflandırılmıştır (Martins ve diğ., 2003). Aflatoksinler, floresan ışıktaki verdikleri renge göre aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ olmak üzere 4 fraksiyona ayrılmaktadır. Aflatoksin B₁ ve B₂ mavi renk, aflatoksin G₁ ve G₂ ise yeşil renk vermektedir (Roussos, 2006). Şekil 2.4'te aflatoksinlerin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.4 : Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂'nin kimyasal yapısı (Url-5).

Şekil 2.4'te görüldüğü gibi aflatoksin B₁ ve B₂ kumarin yapıdaki lakton halkasına eklenmiş siklopentenon halkası, aflatoksin G₁ ve G₂ ise ilave bir lakton halkası içerir. Aflatoksin B₁ (AFB₁), metabolik olarak çeşitli kararlı metabolitlere (aflatoksikol ve aflatoksin M₁) dönüştürülmektedir. İn vivo ya da in vitro ortamda karsinojenite, DNA bağlama, sitotoksisite ve bakteriyel mutajenite gibi varsayılan aktif biyolojik etkilerin oluşumu için NADPH üreten sistemin ve sitokrom P-450 mevcudiyeti gerekmektedir (Martins ve diğ., 2003).

Aflatoksinler, metanol, kloroform ve diğer organik solventlerde çözünür. Suda az çözünür. Stabil yapıdadır, fakat çok düşük veya yüksek pH ve oksijen bulunan ortamda UV ışığa maruz kaldığında aktivitesi azalır (Özkaya ve Temiz, 2003).

2.4.1 Aflatoksin bulunan gıdalar

Aflatoksinler; yerfıstığı, mısır, yağlı tohumlar (El Adlouni ve diğ., 2006; Jolly ve diğ., 2006), pamuk tohumu, baharat (El Adlouni ve diğ., 2006; Murphy ve diğ., 2006), kabuklu yemişler (El Adlouni ve diğ., 2006), incir (Murphy ve diğ., 2006), sofralık siyah zeytin (Yassa ve diğ., 1994; Oral ve Heperkan, 1999; Finoli ve diğ., 2005; El Adlouni ve diğ., 2006), bira (Scott ve Lawrence, 1997) ve zeytinyağı (Toussaint ve diğ., 1997; Daradimos ve diğ., 2000; Finoli ve diğ., 2005) gibi birçok üründe bulunabilmektedir.

Aflatoksin B₁ ve G₁ özellikle bitkisel ürünlerde (Roussos, 2006), aflatoksin M₁ ise süt ve süt ürünlerinde (Ruangwises ve Ruangwises, 2009) bulunmaktadır.

2.4.2 Aflatoksin'in toksisitesi

Yüksek dozda aflatoksin alımı akut toksisite göstermekte ve ölüm ile sonuçlanmaktadır. Düşük dozda, sürekli alım ise kronik toksisite oluşturmaktadır. Kronik toksisite, gelişim geriliği, bağışık sisteminde zayıflama, böbrek hasarı ve karaciğer kanserine neden olmaktadır. Erken safhada teşhisinin zor olması nedeniyle, özellikle bağışıklık sistemi zayıf popülasyon için büyük tehlike arz etmektedir (Klich ve diğ., 2009). Aflatoksinler içerisinde özellikle aflatoksin B₁, hepatokarsinogenik etkisi ile en toksik olanıdır (Rastogi ve diğ., 2005).

Avustralya'da piliçlere uzun süreli olarak 0,5 mg/kg ın üzerinde aflatoksin B₁ (AFB₁) içeren diyet ve yüksek miktarda tek doz olmak üzere iki farklı şekilde toksin uygulanmıştır. Piliçlerde, gıda alımında azalma ve gelişim geriliği belirlenmiştir. Toksik etkinin şiddeti, alınan doza, cinsiyete ve türe bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Özellikle erkek piliçlerin daha hassas olduğu bildirilmiştir. Tek doz halinde AFB₁ alımından 72 saat sonra ölüm vakaları gözlenmiştir. LD₅₀ değeri erkek piliçlerde, 15-18 mg AFB₁/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (Bryden ve diğ., 1980).

Piliçlerde AFB₁'in etkisinin incelendiği bir çalışmada karaciğer mikrozomal proteinini ve elektron transfer bileşenlerini metabolize eden enzimlerde önemli bir artış gözlenmiştir. AFB₁ ve dimetilsülfoksit (DMSO) birlikte uygulandığında, erkek piliçlerde elektron transfer bileşenlerini metabolize eden enzimlerde önemli bir azalma gözlenirken, aynı cins piliçlerin dişi olanlarında önemli bir artış

belirlenmiştir. Sonuçlar, AFB₁ in etkisinin cinsiyete göre değiştiğini göstermektedir (Adav ve Govindwar, 1997).

Deri yolu ile sürekli olarak AFB₁'e maruz kalındığında, düşük doz olsa dahi hepatositlerde dejeneratif değişim olduğu belirtilmiştir (Rastogi ve diğ., 2005).

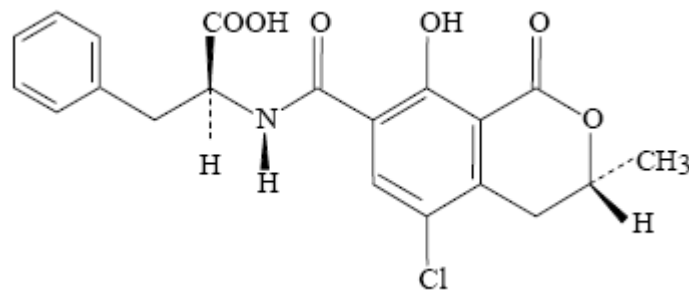
Gana'da yerfıstığı ve mısır tüketiminin fazla olduğu bölgelerde yaşayan insanların kanında AFB₁ miktarının incelendiği çalışmada aflatoksin düzeyi ile sosyo-demografik faktörler arasında bir ilişki olup olmadığı incelenmiştir. Plazmada belirlenen yüksek miktarlarda AFB₁ (0,80 pmol/mg albumin) seviyesi ile eğitim seviyesi, etnik grup, hane halkı sayısı gibi bazı sosyo-demografik faktörler arasında önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Jolly ve diğ., 2006).

Hayvanlar üzerine akut inhalasyon (120 dak.) uygulanan bir çalışmada, DNA hasarı, bağışıklık sisteminde zayıflama ve akciğer problemleri gözlemlendiği belirtilmektedir. Ayrıca bir yıl süresince düzenli olarak aerosol haldeki AFB₁ e maruz kalan farelerde, lenfatik leukemia oluşumunda %38'lik bir artış olduğu bildirilmiştir (Yoltaş ve Haliki-Uztan, 2008).

2.5 Okratoksin A (OTA)

Okratoksin, bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* küf türleri tarafından üretilen sekonder metabolittir (Bellí ve diğ., 2006a; Pardo ve diğ., 2006a; Atou ve diğ., 2007a). Bu küf türleri, çeşitli gıda ürünlerinde hasat öncesinde ya da daha sık olarak depolama esnasında doğal olarak bulunmaktadır (Gallo ve diğ., 2009).

OTA, insanlar için muhtemel karsinojen özellikteki maddeler arasında Grup 2B kategorisinde yer almaktadır (IARC, 1993). Şekil 2.5'te okratoksin A'nın kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.5 : OTA'nın kimyasal yapısı (EFSA, 2004).

Şekil 2.5'te görüldüğü gibi OTA yapısal olarak pentaketide özelliktedir (Atoui ve diğ., 2007b; Gallo ve diğ., 2009). L-fenilalanin amino asidine amid bağlı dihidroizokumarin grubundan türediği düşünülmektedir (Pardo ve diğ., 2006a; Schmidt-Heydt ve diğ., 2008; Gallo ve diğ., 2009). Biyosentezin nasıl bir yolla gerçekleştiği hala tam olarak açıklanamamaktadır. OTA'nın moleküler yapısına bakıldığında biyosentezi için pek çok enzimatik reaksiyon gerektiği belirtilmiştir (Gallo ve diğ., 2009).

Okratoksin A, kokusuz ve kristal yapıdadır (Pohland ve diğ., 1992). Organik solventlerde ve alkali suda çözünabilir (Pardo ve diğ., 2006a).

2.5.1 OTA üreten küfler

OTA üreten küflerin ürünlere bulaşmasının tarla mikroflorasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu mikroflorada *Aspergilli* türleri baskındır (Bavaresco ve diğ., 2008).

OTA oluşumu başlangıçta, Güney Afrika'da *Aspergillus ochraceus* (Patiño ve diğ., 2005; Belli ve diğ., 2007; Schmidt-Heydt ve diğ., 2008; Kapetanakou ve diğ., 2009) türleri ile ilişkilendirilmiştir. Birkaç yıl sonra, *Penicillium verrucosum*'unda OTA oluşturduğu tespit edilmiştir (Cabañes ve diğ., 2002; Mitchell ve diğ., 2004; Pardo ve diğ., 2006a). Ancak, 1990'lı yılların ortalarında, *Aspergillus* Section *Nigri*'nin üzüm ve şarapta okratoksin oluşturabildiği belirlenmiştir. Bu grup içerisinde *Aspergillus carbonarius*, OTA oluşumundan sorumlu asıl küf olarak tanımlanmıştır (Mitchell ve diğ., 2004; Patiño ve diğ., 2005; Belli ve diğ., 2007).

A. melleus, *A. auricomus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. sulfurous*, *A. alliaceus*, *A. albertensis* ve *A. niger* OTA üreten diğer küflerdir (Pardo ve diğ., 2006a).

P. verrucosum, genelde bitkisel ürünlerden, *P. nordicum* ise et ve peynirlerden izole edilmektedir (Lund ve Frisvad, 2003; Gallo ve diğ., 2009). *A. carbonarius*, özellikle Akdeniz Bölgesinde üzüm ve ürünlerinde OTA oluşumunda rol oynamaktadır. *A. ochraceus* (Patiño ve diğ., 2005; Pardo ve diğ., 2006a; Schmidt-Heydt ve diğ., 2008), *A. niger*, *A. carbonarius* (Pardo ve diğ., 2006a), *A. westerdijkiae* ve *A. steynii* (Schmidt-Heydt ve diğ., 2008) ise kahvede OTA oluşumundan sorumlu tutulmaktadır.

2.5.2 OTA'nın bulunduğu gıdalar

Başta tahıllar (Puntarić ve diğ., 2001; Lund ve Frisvad, 2003; Pardo ve diğ., 2006a; Schmidt-Heydt ve diğ., 2008) olmak üzere, yeşil kahve tanesi (Joosten ve diğ., 2001; Leoni ve diğ., 2001), kahve çekirdeği (Batista ve diğ., 2009), instant kahve (Almeida ve diğ., 2007), şarap (Cabañes ve diğ., 2002; Serra ve diğ., 2004), üzüm (Selouane ve diğ., 2009), kuru üzüm (Lombaert ve diğ., 2004; Tjamos ve diğ., 2004), üzüm suyu (Cabañes ve diğ., 2002), kakao, bira (Mitchell ve diğ., 2004; Pardo ve diğ., 2006a), et ve et ürünleri (Jelinek ve diğ., 1989; Monaci ve diğ., 2005; Pardo ve diğ., 2006a; Mateo ve diğ., 2009), kurutulmuş meyveler (Pardo ve diğ., 2006a), Grek tipi siyah zeytin (Ghitakou ve diğ., 2006), peynir (Pardo ve diğ., 2006a), baharatlar (Pardo ve diğ., 2006a), tıbbi bitkiler (Selouane ve diğ., 2009) ve karma yem (Pardo ve diğ., 2006a) OTA izole edilen gıdalardır. OTA ayrıca insanlarda kan plazması ve anne sütünde de belirlenmiştir (Pfohl-Leszkowicz ve Manderville, 2007).

Bazı tahıl ve ürünlerinden oluşan toplam 100 adet örnekte OTA taraması yapılmıştır. Çalışmada, 1 adet aşurelik buğday, 2 adet mısır ve 1 adet yulaf ezmesinde 0,27-9,84 ppb düzeyleri arasında OTA mevcudiyeti belirlenmiştir (Karagözlü ve Karapınar, 2000).

Brezilya'da 132 yeşil kahve örneği OTA varlığı açısından incelendiğinde, 27 kahve örneğinin ortalama olarak 7,1 ng/g konsantrasyonunda OTA içerdiği tespit edilmiştir (Leoni ve diğ., 2001).

Slovenya'da 92 buğday ve 51 mısır örneğinde OTA konsantrasyonu incelenmiştir. Çalışmada, buğday örneklerinin %75,8'inin ve mısır örneklerinin %33,3'ünün sırasıyla 0,02-160 g/kg ve 0,02-40 g/kg düzeyinde OTA içerdiği belirlenmiştir (Puntarić ve diğ., 2001).

Avrupanın güneyinde ve kuzey Afrika'daki şarapların OTA içeriği kuzey bölgelerdekine göre oldukça yüksektir. Üzüm suyu, bazı şaraplardan daha fazla miktarda OTA içerebilmektedir. Bu nedenle çocukların OTA alımında ana neden olarak görülmektedir (Cabañes ve diğ., 2002).

Organik tarımda geleneksel tarıma oranla daha fazla OTA problemi ile karşılaşıldığı belirtilmektedir. Bu ürünlerde mikotoksin gibi diğer toksik maddelerin mevcudiyetinin artması, organik tarımın güvenilirliğini tehlikeye sokmaktadır (Elmholt ve Rasmussen, 2005).

Tayvan’da 51 kahve, 114 hububat, 10 kırmızı şarap ve 18 bira örneğinde OTA varlığı incelenmiştir. 13 (%25) kahve, 5(%50) kırmızı şarap ve 2 (%5) buğday unu örneğinde 0,1-0,5 ppb düzeyleri arasında OTA bulunduğu belirlenmiştir (Lin ve diğ., 2005).

Portekiz’de kişniş örneklerinin incelendiği çalışmada, OTA mevcudiyeti belirlenmemiştir (Lino ve diğ., 2006).

Sert kabuklu yemişlerde OTA içeriği nadiren analizlenmiştir. Farklı marka 23 fıstık örneğinde yapılan tarama çalışmasında bir örnekte yüksek miktarda OTA tespit edilmiştir (Marin ve diğ., 2008).

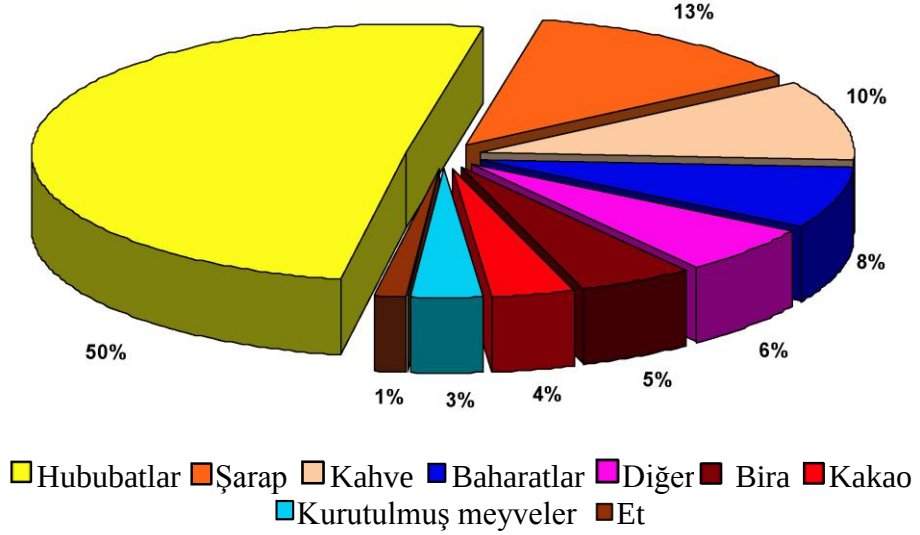
1996 yılından beri şaraplarda (<3-388 ng/L) ve üzüm sularında (<3-311 ng/L) OTA kontaminasyonu raporlanmaktadır (Cabañes ve diğ., 2002). Akdeniz Bölgesinde üretilen şarap örneklerinin %40-60’ının 0,01-15,6 µg/L düzeyinde OTA ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Şarap üretiminde küf ile kontamine üzümler kullanıldığında, OTA önce üzüm suyuna sonra şaraba geçmektedir. Toksinin stabil olması nedeniyle başlangıçtaki miktar yaklaşık olarak sabit düzeyde kalmaktadır (Mateo ve diğ., 2009).

Altmışbir baharat örneğinde yapılan tarama çalışmasında, iki örnekte günlük alımına izin verilen miktarın üzerinde OTA varlığı belirlenmiştir. OTA belirlenen örneklerden birinin aynı zamanda yasal limitlerin üzerinde aflatoksin içerdiği de tespit edilmiştir (Url-6).

Portekizde 60 hayvan yemi örneğinin %8,3’ünde OTA (2,0-3,6 µg/kg) belirlenmiştir (Martins ve diğ., 2003).

2.5.3 Diyet ile OTA alımı

İnsanların OTA’ya maruz kalması, düşük seviyelerde kontamine farklı gıdaların tüketilmesi ile gerçekleşmektedir. Diyetle OTA alım oranı Şekil 2.6’da verilmiştir.



Şekil 2.6 : Diyet ile OTA alım oranı (Miraglia ve Brera, 2002).

Diyet ile alınan Okratoksin A'nın %50'si hububat (Miraglia ve Brera, 2002); Lund ve Frisvad, 2003; Lindblad ve diğ., 2004), %13'ü şarap (Miraglia ve Brera, 2002; Belli ve diğ., 2007; Mateo ve diğ., 2009), %10'u kahve, %8'i baharat, %6'sı meyve suyu vb., %5'i bira, %4'ü kakao, %3'ü kurutulmuş meyve ve %1'i et kaynaklıdır (Miraglia ve Brera, 2002).

2.5.4 OTA'nın toksisitesi

OTA, Grup 2B muhtemel insan karsinojeni olarak sınıflandırılmaktadır (IARC, 1993). OTA, nefrotoksik, teratojenik, immunitoksik (IARC, 1993; Murphy ve diğ., 2006; Kapetanakou ve diğ., 2009), nörotoksik (Bavaresco ve diğ., 2008), hepatotoksik (Gambuti ve diğ., 2005) ve karsinojenik (Pardo ve diğ., 2006a) etki göstermektedir.

OTA, mide-bağırsak yolunda absorbe olmaktadır. Absorbe olan OTA, kan ile esas olarak böbreklere, düşük konsantrasyonlarda da karaciğer, kas ve yağ bulunan bölgelere taşınmaktadır (Url-9). OTA, uzun yarılanma ömrüne sahip olması nedeniyle (serumda yaklaşık olarak 35 gün), insan kanında sıklıkla tespit edilmektedir (Visconti ve diğ., 1999).

Akut toksisitede, organlarda kanama, böbrek hasarı, karaciğer ve lenfatik doku hasarı ve bağırsak iltihapları gözlenmektedir. Oral LD₅₀ değeri, türe ve cinsiyete göre farklılıklar göstermektedir (Url-9).

Oral LD₅₀ değeri, vücut ağırlığı başına tavuk için 3,3 mg/kg (Moura ve diğ., 2004), köpek için 0,2 mg/kg, erkek fare için 30,3 mg/kg (Pfohl-Leszkowicz ve Manderville, 2007), domuz için 1 mg/kg (EFSA, 2004) olarak belirtilmektedir. Köpek ve domuz, OTA'ya en hassas türlerdir.

OTA toksisitesinde hedef organ böbreklerdir (Barišić ve diğ., 2005). Morfolojik böbrek lezyonlarında, proksimal ve distal tüplerde dejenerasyon ve fibroz oluşumu şeklinde karakterize edilmektedir (Martins ve diğ., 2003). Balkan Endemik Nefropati (Pfohl-Leszkowicz ve diğ., 2002; Pardo ve diğ., 2006a) etkeni olup, idrar yolu tümörlerinde artışa neden olmaktadır (Gallo ve diğ., 2009). Balkan Endemik Nefropatisi, Romanya, Bulgaristan ve Bosna gibi ülkelerde gözlenen böbrek rahatsızlığıdır (Lino ve diğ., 2006). OTA kaynaklı gözlenen böbrek hasarının derecesi, toksin dozu ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişmektedir (Gallo ve diğ., 2009). OTA, nefrotoksik özelliği nedeniyle, domuz ve kümes hayvanları endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu mikotoksin, geviş getiren hayvanlarda sağlık sorunu oluşturmamaktadır. Geviş getiren hayvanların rumen bölümündeki mikroorganizmalar tarafından degradasyona uğramaktadır (Pardo ve diğ., 2006a). OTA'nın testis kanseri, Tunus'ta gözlenen nefropati ve Mısır'da görülen üroteliyal tümör oluşumunda rol oynadığı belirtilmektedir (Atoui ve diğ., 2007b). Fenilalanin içeren proteinlerin sentezini inhibe ederek, bağışıklık sistemini baskılayıcı özellik gösterdiği de belirlenmiştir (Pardo ve diğ., 2006a).

OTA'nın sıçan ve farelerde plasentaya geçebildiği bildirilmiştir (Bakker ve Pieters, 2002). OTA ve aflatoksin B₁ in tek veya kombine teratojenik etkisi incelendiğinde, hem OTA hem de aflatoksin B₁ nöral tüp gelişimini bozmuştur. Kombine halde uygulandığında ise, nöral tüp üzerindeki etkileri azalmış ancak kalp defektleri gözlenmiştir. Embriyolar histopatolojik olarak incelendiğinde kalp kasında dejeneratif değişiklikler belirlenmiştir. Bu iki mikotoksine kombine halde maruz kalındığında, OTA'nın etkisinin aflatoksin B₁ tarafından antagonize edildiği düşünülmektedir (Balasaheb Wangikar ve diğ., 2007).

OTA, fare, tavşan ve insanlarda süte geçebilmektedir. Geviş getiren hayvanlarda ise süte geçiş miktarı çok azdır (Url-9). Tarımsal alanlarda yaşayan insanların sütünde, tarımsal alandan uzakta yaşayanlara göre daha fazla miktarda OTA belirlenmiştir (Skaug, 2003).

OTA, DNA kırılmaları, protein sentezi inhibisyonu, glikoneogenez, mitokondride oksidatif fosforilasyonun bozulması ve kanın pıhtılaşmasının engellenmesi gibi pek çok probleme neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonunu arttırmaktadır. ATP azalması sonucu mitokondriyel solunumda inhibisyon, protein sentezinin azalması ile birlikte tRNA sentezinin inhibisyonu neden olmaktadır. Oksidatif stres oluşturmaktadır (Atasayar-Sabuncuoğlu ve diğ., 2008).

OTA'nın, fare ve sıçanlarda bağırsak hassasiyeti, karsinojenite, karaciğer hücrelerinde sitotoksikite ve demir eksikliği anemisine neden olduğu belirtilmektedir (Mateo ve diğ., 2009).

OTA, sitrinin ile birlikte bulunduğu toksisitesi artmaktadır. Sitrinin mevcudiyetinde OTA tarafından domuzlarda oluşturulan böbrek toksijenitesi ve erkek farelerde böbrek tümörleri artmaktadır (El Adlouni ve diğ., 2006).

Okratoksin A uygulanan 20 fareden 6'sında, okratoksin A ve sitrinin'in birlikte uygulandığı 18 fareden 10'unda tümör oluşumu tespit edilmiştir. Bu nedenle sitrinin'in, okratoksin A ile birlikte ilave toksik etki gösterdiği belirtilmektedir (Wijnands ve Leusden, 2000).

OTA karsinojenitesi üzerine Avrupa Birliği mevzuatları dikkate alınırsa, günlük alım (TDI) çok daha az olup, 5 ng/kg vücut ağırlığı/gün değerine tekabül etmektedir. 60 kg bir insan için 300 ng/gün miktarı belirtilmektedir. JECFA tarafından, OTA için tolere edilebilir haftalık alım (TWI) miktarı 100 ng/kg vücut ağırlığı/hafta olarak belirtilmektedir. Bu miktar domuzlarda nefrotoksikite esas alınarak belirlenmiş olup, 60 kg ağırlığında bir kişi için 6 µg/hafta değerine eşdeğerdir (El Adlouni ve diğ., 2006).

2.6 *Aspergillus carbonarius*'un Özellikleri

Siyah *Aspergillus*'lar siyah kolonilere sahip olup, tüm dünyada birçok gıdadan izole edilmektedir (Marín ve diğ., 2008). Siyah aspergilli'nin tümünün yaygın bir şekilde *Aspergillus niger* olarak gösterilmesi nedeniyle *Aspergillus carbonarius*'un gıda ürünlerindeki doğal mevcudiyeti üzerine net bir bilgi mevcut değildir. Halbuki, *A. carbonarius* mikroskobik olarak koloni büyüklüğü ve diziliminden ayırt edilebilmektedir (Cabañes ve diğ., 2002).

A. carbonarius, sıklıkla Güney Avrupa’da izole edilmektedir (Mitchell ve diğ., 2004). *A. carbonarius* gelişimi için optimum sıcaklık değeri 30°C, OTA oluşumu için ise 20°C olarak belirtilmektedir (Bellí ve diğ., 2006a; Valero ve diğ., 2006). *A. carbonarius*, sahip olduğu siyah sporlar sayesinde güneş ışığına oldukça dirençlidir (Bakker ve Pieters, 2002). *A. carbonarius*’un PDA besiyeri ortamındaki görünümü Şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7: *Aspergillus carbonarius*’un PDA’da görünümü (Url-7).

A. carbonarius, izolatlarının %75-100’ü okratoksijenik özellikte olduğundan, yüksek okratoksijenik potansiyeldedir (Patiño ve diğ., 2005; Bavaresco ve diğ., 2008; Kapetanakou ve diğ., 2009).

2.6.1 *A. carbonarius*’un bulunduğu gıdalar

A. carbonarius izole edilen ürünler içerisinde üzüm (Cabañes ve diğ., 2002; Bellí ve diğ., 2006b; Esteban ve diğ., 2006, Atoui ve diğ., 2007a), şarap (Cabañes ve diğ., 2002; Mitchell ve diğ., 2004; Atoui ve diğ., 2007a; Mateo ve diğ., 2009), kahve (Joosten ve diğ., 2001), kahve çekirdeği (Joosten ve diğ., 2001; Noonim ve diğ., 2008), hububatlar, hayvan yemleri, kakao, kurutulmuş meyveler, meyveler, sarımsak, zeytin ve soğan (Marín ve diğ., 2008) yer almaktadır.

A. carbonarius’un üzümlerde OTA kontaminasyonundan sorumlu asıl küf olduğu düşünülmektedir (Gallo ve diğ., 2009).

2.6.2 *A. carbonarius* ile ilgili çalışmalar

A. carbonarius’un üzümde 30-35°C ve 0.96 a_w de optimum gelişim gösterdiği, maksimum OTA oluşumunun ise 15-20°C ve 0,93-0,96 a_w değerlerinde gerçekleştiği belirtilmiştir (Tassou ve diğ., 2007). 0,85 a_w değerinin altında *A. carbonarius*

gelişiminin gözlenmediği, 15°C de gelişimin sadece yüksek a_w değerlerinde (0,925 ve 0,95) gerçekleştiği bildirilmiştir (Romero ve diğ., 2007).

A. carbonarius izolatlarının maksimum gelişiminin sentetik üzüm suyu (SGM) besiyerinde 30-35°C de 0,85-0,98 a_w (Mitchell ve diğ., 2004), 30°C de ise 0,965 a_w (Leong ve diğ., 2006), optimum gelişimin ise czapeck yeast agar (CYA) ve yeast ekstrakt agar (YES) besiyerlerinde 30°C de 0,82-0,99 a_w ve 15°C de 0,94-0,99 a_w değerlerinde gerçekleştiği belirtilmiştir (Esteban ve diğ., 2006).

10°C de *A. carbonarius* izolatlarının, SGM (Mitchell ve diğ., 2004) ve SNM (sentetik nutrient) besiyerinde (Selouane ve diğ., 2009) gelişimi gözlenmemiştir

Medina ve diğ. (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, üzüm suyu benzeri besiyeri ortamında *A. carbonarius* gelişimi 28°C de 0,98 a_w değerinde gerçekleşmiştir. Optimum OTA oluşumu ise 20°C de 0,96-0,98 a_w değerinde gerçekleşmiştir.

OTA oluşumu için optimum koşul olarak, SGM besiyerinde 15-20°C de 0,95-0,98 a_w (Mitchell ve diğ., 2004), 15°C de 0,95-0,98 a_w (Leong ve diğ., 2006), SNM besiyerinde 25-30°C de 0,95-0,99 a_w (Selouane ve diğ., 2009) değerleri belirtilmektedir.

Maksimum OTA oluşumu; SNM’de (0,22 µg/g) 25°C de 0,99 a_w (Selouane ve diğ., 2009), CYA besiyerinde 15-20°C de 0,98-0,99 a_w (Esteban ve diğ., 2006) değerinde gerçekleşmiştir.

CYA besiyerinde OTA oluşumu, YES besiyerinden daha fazla olmuştur. CYA’da OTA miktarı 30°C de 11,92 µg/g ve 15°C de 29,99 µg/g, YES besiyerinde ise 30°C de 0,94 µg/g ve 15°C de 20,27 µg/g olarak belirlenmiştir (Esteban ve diğ., 2006). Cabañes ve diğ. (2002) tarafından, *A. carbonarius* izolatlarının CYA’da 35°C de inkübasyonun 10. gününden sonra 0,22-1,51 µg/g düzeyinde OTA oluşturduğu belirtilmiştir. Aynı besiyerinde optimum OTA oluşum miktarı küf izolatına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Mitchell ve diğ., 2004).

A. carbonarius tarafından Malt Ekstrakt Agar’da (MEA) OTA oluşumu üzerine farklı pH ve su aktivitesi (a_w) değerlerinin etkisi incelendiğinde; OTA miktarının su aktivitesi ile azaldığı, pH’ın ise önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Kapetanakou ve diğ., 2009).

SGM besiyerinde incelenen *A. carbonarius* izolatlarının tümünün 15°C de 0,92 a_w değerinde OTA oluşturduğu, ancak bu su aktivitesi değerinde sıcaklık arttığında OTA miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Maksimum OTA oluşumu belirli bir inkübasyon süresi ile ilişkilendirilememektedir. Çünkü küfün çimlenme ve gelişim hızı üzerine sıcaklığın önemli etkisi bulunmaktadır (Leong ve diğ., 2006).

Hasarlı ve hasarsız sofralık üzüm örneklerinin, okratoksijenik *A. carbonarius* türleri ile inoküle edildiği bir çalışmada farklı bağıl nem ve sıcaklık koşullarının etkisi incelenmiştir. Hasarlı üzümlerde hasarsızlara göre infeksiyon, koloni gelişimi ve OTA oluşumunun daha fazla olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık ve bağıl nemin, infeksiyon ve toksin içeriği üzerine önemli etkisi olmadığı, 30°C de tespit edilen OTA miktarının 20°C de belirlenenden daha fazla olduğu bildirilmiştir. %100 bağıl nem bulunan ortamda maksimum miktarda OTA oluştuğu, %80 ve %90 bağıl nem içeren koşullar arasında önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir (Bellí ve diğ., 2007).

A. carbonarius izolatlarının, yeast ekstrakt agar (YES) ve czapek yeast agarda (CYA) yaklaşık olarak 14 gün sonra, SGM (sentetik üzüm suyu) besiyeri ortamında ise 5-10 günlük inkübasyon sonrasında maksimum OTA oluşturduğu belirtilmiştir (Mitchell ve diğ., 2004).

Bir diğer çalışmada, ürünün tarlada aylarca maruz kaldığı gündüz ve gece ortamının simüle edildiği 24 saatlik foto periyodun *A. carbonarius* gelişimini etkilediği belirlenmiştir. Sürekli olarak 20°C de inkübe edilenlerde gelişim yavaş olmuştur. Gündüz ve gece sıcaklıkları 12 saat aralıklar ile dönüşümlü uygulandığında, sürekli olarak karanlık ortamda bulunanlar sürekli olarak aydınlık ortamda bulunanlardan daha hızlı gelişmiştir. Işık, koloni görünümünde morfolojik değişime neden olmamıştır. Sıcaklık ve fotoperiyot nedeniyle OTA oluşumunda ise önemli farklılık belirlenmemiştir (Bellí ve diğ., 2006b).

Atoui ve diğ., (2007a) tarafından gerçekleştirilen çalışmada OTA'nın başlangıçta küf sporlarında bulunduğu ve aşılama sonrasında ortama salgılandığı belirlenmiştir. 6 saatlik inkübasyon sonrasında besiyerindeki OTA akümüülasyonunun azalması ise OTA'nın sporlarda absorbsiyonuna bağlanmaktadır.

A. carbonarius identifikasyonunda, *A. niger*'e olan benzerlik nedeniyle zorluk yaşanmakta ve fungal taksonominin çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

A. carbonarius'un kantitatif tayini için yarı seçici besiyeri ortamı kullanılabilmektedir. Antibiyotik (kloramfenikol ve klor tetrasiklin) ve fungusit (dikloran ve boskalid) ilave edilen Malt Ekstrakt Agar kullanılarak, ürün daha tarlada olgunlaşma safhasında iken *A. carbonarius* popülasyon ve yoğunluğunun tahminlenebileceği belirtilmiştir (Pollastro ve diğ., 2006).

Üzümden izole edilen 5 *A. carbonarius* türü ile yapılan çalışmada çimlenme, gelişim ve OTA oluşumu üzerine sodyum metabisülfid (NaMBS, mg/L) ve kontrollü atmosfer koşullarının etkisi incelenmiştir. Çimlenme >500 mg/L NaMBS ile inhibe edilmiştir. Gelişimin tamamen inhibe edilebilmesi için 1000 mg/L kadar NaMBS gerekmektedir. OTA oluşumu ise 750 mg/L NaMBS ile inhibe edilebilmektedir. Ancak düşük su aktivitesinde (0,93 a_w), 500 mg/L NaMBS kullanıldığında da OTA oluşumu inhibe edilebilmektedir. Kontrollü atmosfer koşullarının spor çimlenmesi üzerine etkisi çok az olmuştur (Pateraki ve diğ., 2007).

İspanya ve Tunus'ta üzümlerden izole edilmiş olan *A. carbonarius* ile yapılan çalışmada, üzüm benzeri besiyeri ortamı kullanılmıştır. Gelişim ve OTA oluşumu 20°C de en fazla olmuştur. Bunu daha sonra 25, 15, 30 ve 35°C takip etmiştir. 7 ve 42°C sıcaklık derecelerinde 10 günlük inkübasyon sürecinde gelişim gözlenmemiştir. 35°C de 10 gün inkübasyon da gelişim maksimum olmasına rağmen OTA oluşumu az olmuştur. 30°C de inkübasyonun 6-8. günlerinde maksimum OTA akümülayonu olmuş sonra stabil kalmıştır. Yüksek sıcaklıklarda OTA akümülayonunun erken başladığı, ancak yavaş bir şekilde artarak, birkaç gün içinde sabitlendiği belirlenmiştir (Marín ve diğ., 2006).

Doğal olarak mevcut fenolik bileşenlerin *A. carbonarius* gelişimine ve OTA oluşumuna etkisi incelenmiştir. Czapek Yeast Ekstrakt Agar içerisine kafeik asit ve quercetin flavonoidleri 50-500 mg/L aralığında ki konsantrasyonda ilave edilmiştir. Tüm fenolik bileşenlerin, 250 mg/L konsantrasyonunda *A. carbonarius* gelişim oranı ve lag faz üzerine önemli bir şekilde etki etmiştir. 500 mg/L konsantrasyonunda ise gelişim tamamen inhibe edilmiştir. Kontrol örneği ile karşılaştırıldığında, fenolik bileşenlerin OTA oluşumunda önemli bir azalma sağladığı gözlenmiştir. Doğal fenolik bileşenler, küf gelişimi ve OTA oluşumu üzerine inhibe edici etkilerinin bulunması nedeniyle kimyasal fungusitlere alternatif olarak uygulanabilir (Romero ve diğ., 2009).

Kırmızı üzüm suyu kaynaklı besiyeri ortamının kullanıldığı çalışmada *A. carbonarius* gelişimi ve OTA oluşumu üzerine carbendazim fungisitinin etkisi incelenmiştir. Çalışmada carbendazim'in *A. carbonarius* gelişimi ve OTA oluşumu için etkin bir kontrol sağlamadığı belirtilmiştir (Medina ve diğ., 2007).

2.7 *Penicillium verrucosum*'un Özellikleri

Penicillium verrucosum, ılıman ve soğuk iklimlerde OTA üreticisi olarak bilinmektedir (Cabañes ve diğ., 2002). 0-31°C sıcaklık aralığında gelişebilmektedir (Pitt ve Hocking, 1997). Küf gelişimi için optimum sıcaklık değeri 20°C dir (Pardo ve diğ., 2006b). OTA oluşumu için optimum sıcaklık ve a_w değeri sırasıyla 25°C ve 0,90-0,98 olarak belirtilmektedir (Murphy ve diğ., 2006). Şekil 2.8'de *P. verrucosum*'un MEA ve CYA besiyeri ortamlarındaki görünümü verilmiştir.



Şekil 2.8: *Penicillium verrucosum*'un MEA ve CYA besiyerinde görünümü (Url-8).

P. verrucosum izolatları YES ve CYA besi ortamlarında 25°C de 7 gün inkübe edildiğinde, izolatların en az %66'sının OTA oluşturduğu belirtilmektedir (Frisvad ve diğ., 2005). Düşük a_w (>0,80) değerlerinde dahi OTA'nın oluştuğu bildirilmektedir (Lin ve diğ., 2005). Lag faz üzerine a_w 'nin etkisi sıcaklıktaki azalma ile artmaktadır. 20-30°C de spor germinasyonu 0,80 a_w değerinde gerçekleşirken, 10°C de germinasyon için gerekli minimum a_w değeri 0,85 tir (Pardo ve diğ., 2006a).

25 °C'de CYA (Czapek Yeast Extract Agar) ve MEA (Malt Extract Agar) besiyerinde 7 gün inkübasyon sonrasında sırasıyla 18-24 mm ve 13-18 mm çapında koloni oluştuğu belirlenmiştir (Pitt, 1987).

BMEA (Barley meal extract agar) da 0,80 a_w değerinde *P. verrucosum* izolatlarının misel gelişimi gözlenmemiştir. Gelişim için gerekli minimum a_w değerleri; 30°C de 0,85 ve 10-20°C de 0,90 dır (Pardo ve diğ., 2006b).

P. verrucosum tespitinde DYSG (Dichloran yeast sucrose agar) besiyeri ortamının DRYES (Dichloran rose bengal yeast extract sucrose agar) ve DG18 (Dichloran %18 glycerol agar) besiyerlerine göre çok daha etkin olduğu belirlenmiştir. *P. verrucosum* tespiti açısından, DRYES ve DG18 arasında önemli bir farklılık belirlenmemiştir (Lund ve Frisvad, 2003).

Oluşan mikotoksin miktarı üzerine besiyeri çeşidinin etkisi olduğu, ancak besiyeri formülasyonundaki radikal değişikliklerin oluşan toksin çeşidini etkilemediği belirtilmiştir (Pitt, 1987).

Biyoaktif fungal bileşenlerin oluşumu kültür koşullarından etkilenmekte olup, genellikle idiofaz esnasında ve fungal gelişim sonrasında (trofofaz) gerçekleşmektedir. Besin, inkübasyon periyodu, pH, sıcaklık gibi koşullar küf gelişimi ve toksin oluşumu üzerine etkilidir. *P. verrucosum* gelişimi ve sekonder metabolit oluşumu için azot kaynağı olarak peptidlere ihtiyaç bulunmaktadır (Elias ve diğ., 2006).

Sentetik besiyerinde elde edilen gelişim oranı arpa ve kavrulmamış çekirdek kahvede gözlenen gelişim oranından daha yüksek olmuştur. Bu durumun, besiyerinin fiziksel ve kimyasal karakteristiği nedeniyle olabileceği belirtilmiştir. Çünkü, besiyeri ortamı küf gelişimi için gerekli besin maddelerini homojen bir şekilde içermektedir (Pardo ve diğ., 2006b).

Penicillium verrucosum, farklı iklim koşullarında gelişebilme özelliğine sahip okratoksijenik tür olduğundan, gıdaların OTA ile kontaminasyonu dünya üzerinde yaygın bir şekilde olabilmektedir (Pardo ve diğ., 2006a).

2.7.1 *P. verrucosum*'un bulunduğu gıdalar

P. verrucosum izolatları, yaygın bir şekilde hububatlardan (Cabañes ve diğ., 2002; Lindblad ve diğ., 2004; Elmholt ve Rasmussen, 2005) ve buğday unundan (Cabañas ve diğ., 2008) izole edilmiştir. Ayrıca, Heperkan ve diğ. (2006) tarafından siyah zeytinden de izole edilmiştir.

Arpalarda en baskın okratoksijenik kontaminantın *P. verrucosum* olduğu bildirilmektedir (Pardo ve diğ., 2006a).

Buğday unlarının incelendiği bir çalışmada, OTA üreten tür olarak sadece *P. verrucosum* tespit edilmiştir. Bu küf türüne ait 17 izolatın %64,7'si OTA oluşturmuştur (Cabañas ve diğ., 2008).

Hububatların OTA ile kontaminasyonu genellikle hasat sonrası karşılaşılan bir problemdir. Özellikle Avrupa'nın kuzeyinde serin iklim koşullarında hasat edilen ürünlerde OTA'nın *P. verrucosum* tarafından oluşturulduğu bildirilmektedir (Aldred ve diğ., 2008).

2.7.2 *P. verrucosum* ile ilgili çalışmalar

Elmholt ve Rasmussen (2005) tarafından, 78 hububat örneğinin incelendiği çalışmada, örneklerin %80'inden fazlasının *P. verrucosum* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Hububatların çoğunun kurutma ve depolama öncesinde kontamine olduğu belirtilmektedir. Ürünlerin erken kontaminasyonunun nedeni tam olarak anlaşılamamakla birlikte bazı toprak örneklerinin *P. verrucosum* içerdiği belirtilmektedir. *P. verrucosum* konidyalı toprakta aylarca canlı kalabilmektedir.

194 hububat örneğinin %82'sinin *P. verrucosum* ile kontamine olduğu, %33'ünün ise yasal limit olan 5 µg/kg değerinin üzerinde OTA içerdiği belirtilmiştir (Lindblad ve diğ., 2004).

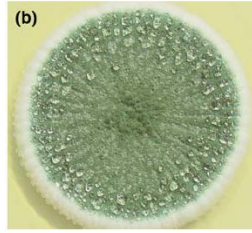
Beyaz un, tam buğday ununa göre daha az OTA içermektedir. Çünkü beyaz unda, yüksek miktarlarda OTA içeren kepek kısmı uzaklaştırılmaktadır. Pişirme aşamasındaki toksin miktarındaki azalma çok düşük olmaktadır. Ayrıca, unda bulunan *P. verrucosum* konidyalı yıllarca canlı kalabilmektedir. Bu nedenle unun depolanmasına çok dikkat edilmelidir. Unun su aktivite değeri OTA oluşumu ya da gelişim için çok düşük değerlerde olmasına rağmen, nem içeriğindeki %1 ya da %2 miktarında bir değişim dahi küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu için yeterli olabilmektedir (Cabañas ve diğ., 2008).

Ekmek analogunda yapılan çalışmada *P. verrucosum* gelişimi için optimum a_w 0,96-0,97 ve pH 6 olarak belirtilmiştir. OTA oluşumu ise küf suşu, pH ve a_w den önemli bir şekilde etkilenmektedir. Bu koşullarda 75-80 µg/g düzeyinde OTA oluşmuştur. Ancak, pH 4,5 değerinde optimum OTA oluşumu 0,95 a_w değerinde

gerçekleşmiş olup, maksimum miktar yaklaşık olarak 25-35 µg/g düzeyindedir (Arroyo ve diğ., 2005).

Okratoksijenik *P. verrucosum* izolatlarında spor çimlenmesi ve misel gelişimi, su aktivitesi ve sıcaklıktan önemli bir şekilde etkilenmektedir. *P. verrucosum* çimlenme oranı düşük a_w değerlerinde azalmaktadır (Pardo ve diğ., 2006a).

P. verrucosum izolatları Czapek maya ekstrakt (CYA) agarda 25°C de 10-14 gün geliştirildiğinde glutation damlacığı oluşturmaktadır. Bu damlacığın mikotoksin içeriği incelendiğinde yüksek miktarda okratoksin A (92,7-8667,0 ng/ml) belirlenmiştir. Misellerde okratoksin miktarı daha azdır (9,0-819,3 ng/g OTA). Agarın küf gelişimi olmayan bölümünde ise 15,3-417,0 ng/g OTA belirlenmiştir. Çalışmada, toksijenik *Penicillium* izolatları tarafından glutation damlacığı içerisine yüksek miktarlarda mikotoksin salgılandığı belirlenmiştir (Gareis ve Gareis, 2007). Şekil 2.9' da glutation damlacığı görülmektedir.



Şekil 2.9 : *Penicillium verrucosum* küf kolonisi üzerindeki glutation damlacığı (Gareis ve Gareis, 2007).

Penicillium spp. ilginç bir şekilde glutation damlacığı oluşturabilme yeteneğindedir. CYA besiyerinde 10-14 günde 110 µL kadar guttation damlacığı oluşturulabildiği belirlenmiştir. *P. verrucosum* için damlacıkta bulunabilen OTA konsantrasyonunun 8 ppm'e kadar çıkabildiği tespit edilmiştir. Glutation damlacığı içerisine yüksek miktarda toksin salgılanmasının nedeni tam olarak bilinmemektedir (Gareis ve Gareis, 2007).

Defne, sarımsak ve tarçın esansiyel yağları ve resveratrol antioksidanının, *P. verrucosum* gelişimine ve OTA oluşumuna etkisinin incelendiği çalışmada en etkili kontrol resveratrol uygulaması ile sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan diğer esansiyel yağlarda aynı başarı sağlanamamıştır. 200 µg/g düzeyinde resveratrol uygulanan örnekler 15/25°C, 0,85-0,995 a_w değerinde 28 gün depolandığında depolama periyodunun sonunda mikotoksijenik türlerin popülasyonunda ve OTA kontaminasyonunda %60'tan fazla azalma gözlenmiştir (Aldred ve diğ., 2008).

P. verrucosum, tarımsal ürünlerde OTA oluşumundan sorumlu asıl küflerden biridir. OTA kontaminasyon riskini belirleyebilmek için *P. verrucosum*'un tarladaki ekolojisinin bilinmesi gerekmektedir. Elmholt ve diğ (1999) tarafından toprak örneklerindeki *P. verrucosum* popülasyonunun tahminlenmesinde DYSG (Dikloran yeast ekstrakt sukroz agar) besiyerinin kullanılabileceği belirtilmiştir.

2.8 Aflatoksin ve OTA Detoksifikasyonu İle İlgili Çalışmalar

Mikotoksin detoksifikasyonunda ısıtma işlemi uygulaması, doğal veya sentetik kimyasalların kullanımı ve biyolojik yöntemler etkilidir.

Aflatoksin kontaminasyonu olan mısır ve mısır ürünlerinde alkali ile ısıtmanın toksin miktarında azalma sağladığı, fırında kızartma veya pişirme işleminin de etkin bir koruma sağladığı belirtilmektedir (Torres ve diğ., 2003).

OTA'nın gıda işleme esnasında çok stabil olduğu belirtilmektedir (El Adlouni ve diğ., 2006). Gıdaya uygulanan ısıtma işlemi (fırınlama) ile, OTA miktarında yaklaşık olarak %20 oranında bir azalma sağlandığı aynı etkinin kaynatma işleminde gözlenmediği bildirilmiştir (Puntarić ve diğ., 2001). Farklı sıcaklık derecelerinde kavrulan kahve çekirdeklerinde, artan sıcaklık ile OTA içeriğinde azalma tespit edilmiştir (Van Der Stegen ve diğ., 2001).

Mikotoksinler, serbest radikal oluşumuna neden olabiliğinden, sitotoksikite ve hepatokanserojenitede rol oynamaktadır. Mikotoksinlerin neden olduğu bu etkilerin önlenmesinde antioksidan kullanımı önemlidir.

Aflatoksin B₁ (AFB₁)-DNA eklentisi üzerine sıçan hepatositlerinde yapılan bir çalışmada en yüksek inhibisyonun A vitamini ile sağlandığı belirtilmektedir (Yu ve diğ., 1994).

Tavşanlarda AFB₁ in sperm kalitesini azalttığı belirlenen bir çalışmada, tavşanlara araşidonik asit verildiğinde bu zararlı etkilere karşı koruyucu rol oynadığı belirlenmiştir (Salem ve diğ., 2001).

AFB₁ uygulaması sonrası, sıçan testislerinde lipid peroksidasyonunda artış ve biyokimyasal fonksiyon bozuklukları gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini uygulandığında ise, belirlenen bu toksisitenin büyük oranda düzeldiği tespit edilmiştir (Verma ve diğ., 2001).

Melatoninin, hidroksil radikali gibi toksik serbest radikallere elektron vererek radikalleri detoksifiye ettiği belirtilmektedir. OTA nedeniyle oluşan oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmektedir (Soyoz ve diğ., 2004).

Deney hayvanlarında OTA ve melatonin etkisinin incelendiği bir başka çalışmada da melatoninin OTA kaynaklı olumsuz etkilere karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada melatoninin oksijen ve azot kaynaklı reaktif ürünleri taşıdığı, antioksidan enzimleri uyardığı, serbest radikal oluşumunu sınırlayarak elektron taşıma zincirinin etkinliğini arttırdığı ve ATP sentezine yardımcı olduğu belirtilmiştir (Abdel-Wahhab ve diğ., 2005).

AFB₁ ve likopenin eř zamanlı olarak uygulandığı deney hayvanlarında, likopen AFB₁ kaynaklı toksik etkilerde azalma sağlamıştır (Tang ve diğ., 2007).

Sıçanlarda AFB₁ in oluşturduğu kanserojenite üzerine yeşil çayın koruyucu etkisinin incelendiği bir çalışmada, sıçanlara 2-4 hafta süresince %0,5 oranında yeşil çay bulunan içme suyu verilmiştir. Çalışmada aflatoksin metabolitleri ve AFB₁-DNA eklentisi oluşumunun inhibe olduğu belirtilmiştir (Qin ve diğ., 1997).

Sarımsağın içeriğindeki kükürt bileşikleri nedeniyle antikanserojenik özellik gösterdiği ve AFB₁ in hepatokanserojenik etkisine karşı antikanserojenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Guyonnet ve diğ., 2002).

Su yosunlarıda içeriğinde bulunan yüksek konsantrasyondaki mineral ve vitaminler nedeniyle antioksidan ve antikarsinojenik etki göstermektedir. Sıçanlarda AFB₁ ve su yosunu eř zamanlı olarak uygulandığında, yosun hepatokanserojeniteye karşı antioksidan savunma sistemini uyarıcı etki göstermiş ve hepatik hücrelerde onarım sağlamıştır (Abdel-Wahhab ve diğ., 2006).

Kimyasalların küfler üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, switch adlı fungusit uygulandığında OTA oluşturan *Aspergillus* spp.'de önemli bir azalma gözlenmiştir. Tersine olarak üzüm bağlarına carbendazim ya da chorus fungusitleri uygulandığında kuru üzümlerdeki küflerin kontrolünde etkili olmamıştır (Tjamos ve diğ., 2004).

Mikotoksinlerin detoksifikasyonunda mikroorganizmalar kullanılabilmektedir. Örneğin *Flavobacterium aurantiacum* aflatoksinleri detoksifiye edebilme yeteneğindedir. *Phenylobacterium immobile* aerobik bir bakteri olup, OTA'yı degrade ettiği belirtilmektedir (Schatzmayr ve diğ., 2006).

Gıdada mevcut mikroflora, OTA detoksifikasyonunu ve OTA seviyesinde azalmayı sağlayabilir. Bu durum da dikkate alınmalıdır (Kapetanakou ve diğ., 2009).

Ortamdaki besin mevcudiyeti sekonder metabolizmayı etkilemektedir. Çalışmada incelenen *Pichia anomala* ve *Saccharomyces cerevisiae* mayalarının her ikisinin de *P. verrucosum* gelişiminde ve OTA akümülyasyonunda azalma sağladığı belirlenmiştir. Mikotoksin oluşumunu engellemek için gerekli olan maya seviyesinin, küf gelişimini önlemek için gereken maya seviyesinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Her iki maya türü *P. verrucosum* gelişiminde aynı oranda azalma sağlamıştır (Petersson ve diğ., 1998).

Nemli hububatlarda bazen alifatik asit fungistatları uygulanarak mikotoksijenik küflerin gelişimi kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Ancak böyle bir uygulamanın çok geniş bir alanı kapsaması gerekmektedir (Aldred ve diğ., 2008).

Üzüm ya da diğer gıdalarda OTA'nın önlenmesi için üretici küfün erken safhada tespitini sağlayan hızlı ve spesifik metotlara ihtiyaç vardır. Klasik yöntem olarak kullanılan metotlar, zaman alıcı olup uzmanlık gerektirmektedir. Günümüzde PCR uygulanan metotlar, hedef organizma için daha spesifik, hassas ve hızlı tespit olanağı sağlamaktadır. PCR metotlarının geliştirilmesinde en önemli faktör ise, ilgili organizma için tasarlanan hedef DNA sekansının güvenilirliğidir (Atoui ve diğ., 2007a).

Fungal poliketid sentezi (PKSs), çeşitli mikotoksinlerin ve diğer sekonder metabolitlerin biyosentezinden sorumludur (Atoui ve diğ., 2006; Gallo ve diğ., 2009). PKS dizilimlerinin belirlenmesinin, mikotoksin oluşumundan sorumlu küflerin direkt tespitine ve kantitatif tayinine yardımcı olabileceği belirtilmektedir (Atoui ve diğ., 2006).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Zeytin ve zeytinyağı örnekleri

Zeytin ve zeytinyağında aflatoksin ve okratoksin A varlığının belirlenmesi amacıyla 2007 yılında İstanbul ve çevresindeki halk pazarlarından tesadüfi örnekleme yöntemi ile örnekler temin edilmiştir. Siyah zeytin örnek sayısı 30 ve sızma zeytinyağı örnek sayısı 30 olup, toplam örnek sayısı 60 dır.

Zeytin örnekleri analiz edilinceye kadar polietilen torbalarda -18°C de saklanmıştır. Analiz öncesinde zeytin örnekleri çözündürülüp, oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilmiştir. Her bir zeytin örneğinden yaklaşık olarak 250 g'lık porsiyonun çekirdeği çıkarılmış ve blender ile parçalanarak homojenize edilmiştir.

Sızma zeytinyağı örnekleri ise orijinal şişelerinde (1L) buzdolabı koşullarında saklanmıştır. Analiz öncesinde oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilmiş ve herhangi bir işlem uygulanmadan doğrudan analize alınmıştır.

Tarama çalışmasının sonucunda elde edilen bulgulara göre örneklerde mevcut olan mikotoksinin çeşidi belirlenmiş ve bu mikotoksini oluşturan iki farklı cinse ait küf türü zeytine aşılantmıştır.

Aşılama çalışmalarında kullanılan sofralık siyah zeytin örnekleri tek bir üreticiden temin edilmiştir. *Aspergillus carbonarius* ve *Penicillium verrucosum* ile aşılama öncesinde, zeytin örnekleri OTA varlığı açısından test edilmiştir. OTA içermediği belirlendikten sonra, zeytin tanelerinin çekirdekleri çıkarılmış ve blender ile parçalanarak zeytin ezmesi haline getirilmiştir. Zeytin ezmesi 121°C de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.1.2 Küf suşları

Bu çalışmada zeytinlerin aşılantmasında kullanılan *A. carbonarius*, OTA üreticisi olarak identifiye edilmiş olup, İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği

Bölümü'nden temin edilmiştir. *P. verrucosum* (CBS-223.71), Hollanda'daki Kültür Koleksiyonu Merkezi'nden (CBS) tedarik edilmiştir.

A. carbonarius ve *P. verrucosum*, analizler esnasında kullanılıncaya kadar saf kültür halinde sırasıyla yatık Malt Ekstrakt Agar (MEA-Oxoid, Ltd.) ve Sabouraud Dekstroz Agar (SDA-Oxoid, Ltd.) bulunan tüpler içerisinde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3 Sarf malzemeleri

3.1.3.1 Kimyasal sarflar

Aflatoksin ve okratoksin A (OTA) standartları Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) den satın alınmıştır.

Çalışmada kullanılan analitik ve HPLC grade ajanlar Merck'ten (Darmstadt, Almanya) ve phosphate buffered saline (PBS) Oxoid'den (Hampshire, İngiltere) satın alınmıştır. Her bir PBS tableti, 100 ml distile su içerisinde eritilmektedir. Hazırlanan solüsyonun pH değeri 25°C de 7,3'tür.

Aflatoksin ve OTA immunoaffinite kolonları Romer (Avusturya)'dan temin edilmiştir.

Zeytinleri aşılama çalışmasında kullanılan steril numune kapları, hazır olarak üreticisinden temin edilmiştir.

3.1.3.2 Besiyerleri

Malt Ekstrakt Agar (MEA-CM0059), Sabouraud Dekstroz Agar (SDA-CM0041) ve peptonlu su (L37) Oxoid'den temin edilmiştir.

Malt Ekstrakt Agar bileşimi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Malt ekstrakt agar bileşimi.

Bileşen	Miktar (g)
Malt ekstrakt	30,0
Mikrobiyolojik pepton	5,0
Agar	15,0

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 50 g tartılarak 1 L distile su ile çözülmüştür. Agar eriyene kadar kaynar su banyosunda tutulmuştur. Tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra, otoklavda 115°C'de 10 dakika sterilize edilmiştir.

Sterilizasyon işlemi sonrasında tüpler eğimli bir şekilde yerleştirilmiş ve MEA'nın katılaşması beklenmiştir.

Sabouraud Dekstroz Agar bileşimi Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 : Sabouraud dekstroz agar bileşimi.

Bileşen	Miktar (g)
Mikrobiyolojik pepton	10,0
Glukoz (dekstroz)	40,0
Agar	15,0

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 65 g tartılarak 1 L distile su ile çözülmüştür. Tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Tüpler otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işlemi sonrasında tüpler eğimli bir şekilde yerleştirilmiş ve SDA'nın katılaşması beklenmiştir.

Peptonlu su bileşimi Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 : Peptonlu su bileşimi.

Bileşen	Miktar (g)
Pepton	10,0
Sodyum klorür	5,0
Di potasyum hidrojen fosfat	9,0
Potasyum dihidrojen fosfat	1,5

Bileşimi verilen hazır peptonlu su formülasyonundan 25 g tartılarak 1 L distile su ile çözülmüştür. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.1.4 Alet-ekipman

Bu çalışmada otoklav (Eryiğit ERS 2000 D, Türkiye), inkübatör (Binder WTB, Tuttlinger, Almanya), çalkalayıcı (Heidolp Vibramax 100, Almanya), Ultrasonik Banyo (Bandelin Sonorex RK 510 H, Almanya), vorteks (Ika Lab VF2, Janke&Kunkel GMBH&CO.KG) ve Gaz Kromatografi Cihazı (ThermoQuest Trace GC 2000, İtalya) kullanılmıştır. Aflatoksin B₁, aflatoksin G₁ ve OTA analizleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan HPLC cihazı (Agilent Technologies 1100 System); bir vakum degazer, bir quaternary pompa, 100 µL'lik loop içeren bir otosampler, bir floresans dedektör ve aflatoksin türevlendirme işlemini sağlayan Kobra-Cell den oluşmaktadır.

3.2 Metot

3.2.1 Kimyasal analizler

3.2.1.1 Nem tayini

Nem miktarı AOAC (2000)'nin 925.40 numaralı metoduna göre tayin edilmiştir. Yaklaşık 2 g örnek, 95-100°C de sabit ağırlığa gelinceye kadar bekletilmiştir. Ağırlıkça kayıp % nem olarak hesaplanmıştır.

3.2.1.2 Yağ tayini

Yağ miktarı, AOAC (2000)'nin 948.22 numaralı metoduna göre Soxhelet yöntemiyle tayin edilmiştir. Yaklaşık olarak 2 g zeytin örneği, 16 saat süreyle eter ile ekstrakte edilmiştir. Eter, döner buharlaştırıcıyla uçurulduktan sonra 95-100°C de 30 dakika kurutularak sabit ağırlığa gelinceye kadar beklenmiştir. Desikatörde soğutulmuş, tartım yapılmış ve ürünlerdeki yağ miktarı hesaplanmıştır.

3.2.1.3 Protein tayini

Protein tayini, LECO Azot-Protein tayin cihazı kullanılarak firmanın analiz talimatına göre gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen % azot değeri, zeytin için olan çevirme faktörü ile çarpılarak protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.1.4 Kül tayini

Kül miktarı tayininde, örnekler 550°C'deki fırında karbon kalıntıları görülmeyinceye ve sabit tartıma ulaşınca kadar yakılmıştır. Elde edilen kül tartılarak miktar tayini yapılmıştır (TS- 2131 ISO 928, 2001).

3.2.1.5 pH tayini

pH ölçümü, Mettler Toledo pH metre kullanılarak yapılmıştır. Ölçümlerden önce pH metre kalibrasyonu yapılmıştır.

3.2.1.6 Tuz tayini

Zeytinde tuz tayini için, çekirdeği çıkarılıp ezme haline getirilmiş zeytinden 250 mL'lik bir erlen içerisine 2 g tartılmıştır. 100 mL damıtık su ilave edilerek 30-40 dakika kaynatılmış, 6 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 100 mL'lik ölçü balonu içine süzölmüş ve 100 mL'ye tamamlanmıştır. İyice karıştırılan çözeltiden 2

ml alınmış, üzerine 50 mL damıtık su ve 2-3 damla potasyum kromat çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım gümüş nitrat çözeltisi ile sabit kiremit kırmızısı renge dönünceye kadar titre edilmiştir (TS-774, 2003). Sonuç NaCl cinsinden % tuz miktarı olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (3.1).

$$\%Tuz = \frac{VxMx5,85x50}{m} \quad (3.1)$$

V: Harcanan gümüş nitrat çözeltisinin miktarı, mL

M: Gümüş nitrat çözeltisinin molaritesi, mol/L

m: Numune zeytin kütlesi, g

3.2.1.7 Asitlik tayini

Çekirdeği çıkarılmış zeytin ezmesinden 10 g bir erlene tartılmış, üzerine 90 mL damıtık su ilave edilmiştir. Ara sıra karıştırılarak 24 saat bekletilmiş ve 100 mL'lik bir ölçülü balona süzölmüştür. Süzöntüden 10 mL alınarak, 250 ml'lik erlene konulmuş ve bir iki damla fenolftalein damlatılıp çalkalanmıştır. Üzerine 20 mL damıtık su ilave edilip, kalıcı pembe renk meydana gelinceye kadar sodyum hidroksit çözeltisi ile titre edilmiştir (TS-774, 2003). % asitlik miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (3.2).

$$\%Asitlik = \frac{VxMx90}{m} \quad (3.2)$$

V: Harcanan sodyum hidroksit çözeltisinin miktarı, ml

M: Sodyum hidroksit çözeltisinin molaritesi, (0,1 M)

m: Zeytin numunesinin kütlesi, g

3.2.1.8 Yağ asidi kompozisyonu tayini

Zeytin örneklerinin üzerini kaplayacak kadar hekzan konularak, mekanik çalkalayıcıda 10 dakika karıştırılmıştır. Hekzan ve zeytin karışımı 1 gece bekletildikten sonra Whatman kağıdından süzölmüş ve rotary evaporatörde hekzan uçurulmuştur. Elde edilen ekstraktan iki paralel olacak şekilde 0,1 mL örnek alınmış, AOAC (2000)'nin 969.33 metil esterlerin hazırlanması-borontriflorür

metodu uygulanarak metillendirme işlemi yapılmış ve GC' de (Gas Chromatography, ThermoQuest, İtalya) analiz edilmiştir.

3.2.2 Spor süspansiyonunun hazırlanması

A. carbonarius ve *P. verrucosum* sırasıyla 5 mL malt ekstrakt agar (MEA) ve 5 mL saboured dektroz agar (SDA) (Oxoid, Hampshire, İngiltere) içeren test tüpleri içerisinde 25°C de 7 gün inkübe edilerek geliştirilmiştir. Bu kültürlerden her bir küf türüne ait sporlar, %0,05 tween80 içeren steril peptonlu su içerisine toplanmıştır.

Sporların son konsantrasyonu, bir Thoma lamı kullanılarak x40 objektif ayarında mikroskop ile sayılmış ve 10^6 spor/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan her bir spor süspansiyonu, zeytin ezmesi örneklerini aşılama da kullanılmıştır.

3.2.3 Zeytin ezmesi örneklerinin aşılama

15 g steril zeytin ezmesi örneği, steril numune kapları içerisine aseptik koşullarda tartılmış ve 10^6 spor/ml olacak şekilde spor süspansiyonu ile aşılamaştır. Üzerine 3 ml steril su eklenmiştir. Su aktivitesi (a_w), 0,92 olarak ölçülmüştür. Aşılama zeytin ezmesi örnekleri, homojen dağılımı sağlamak için iyice karıştırılmış ve farklı sıcaklık derecelerinde 21 gün süresince inkübe edilmiştir. Her bir küf türü (*A. carbonarius* ve *P. verrucosum*), sıcaklık derecesi (10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C) ve inkübasyon süresi (1., 3., 5., 7., 14. ve 21. günler) için ayrı örnek kapları hazırlanmış olup, her bir koşul için 2 tekrarlı analiz tasarlanmıştır.

3.2.4 Su aktivitesi tayini

Aşılama zeytin ezmesi örneklerinin su aktivitesi, Pawkit su aktivitesi ölçüm cihazı ile belirlenmiştir.

3.2.5 HPLC koşulları

Kromatografik ayırma oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Aflatoksin [su:asetonitril:metanol (6:2:3, v/v/v) + 100 µL/L %65'lik HNO₃ + 120 mg/L KBr] ve OTA [su:asetonitril:asetik asit (60:40:2, v/v/v)] mobil fazlarının her ikisi de kullanım öncesi Sartorius Minisart SRP15 (0,45µm) filtreden geçirilmiştir. Mobil faz akış hızı 1 ml/dak.'dır.

HPLC’de ayırma işlemi için, C₁₈ kolon (Waters Spherisorb 5 µm, ODS2, 4.6 x 250 mm, Milford, Massachusetts, USA) kullanılmıştır. AFB₁ tespiti λ_{exc} 365 nm, λ_{em} 425 nm de ve OTA tespiti λ_{exc} 335 nm, λ_{em} 465 nm de gerçekleştirilmiştir.

AFB₁, AFG₁ve OTA için tayin limiti sırasıyla, 0,03 µg/kg, 0,05 µg/kg ve 0,3 µg/kg dır.

3.2.6 Kalibrasyon eğrisi

3.2.6.1 Aflatoksin B₁ kalibrasyon eğrisi

Aflatoksin stok standardı, metanolde çözülmüş olarak temin edilmiştir. 0-4°C arasında saklanmış ve analiz öncesinde oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Standart, Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ (1:0,3:1:0,3 ppm) karışımından oluşmaktadır.

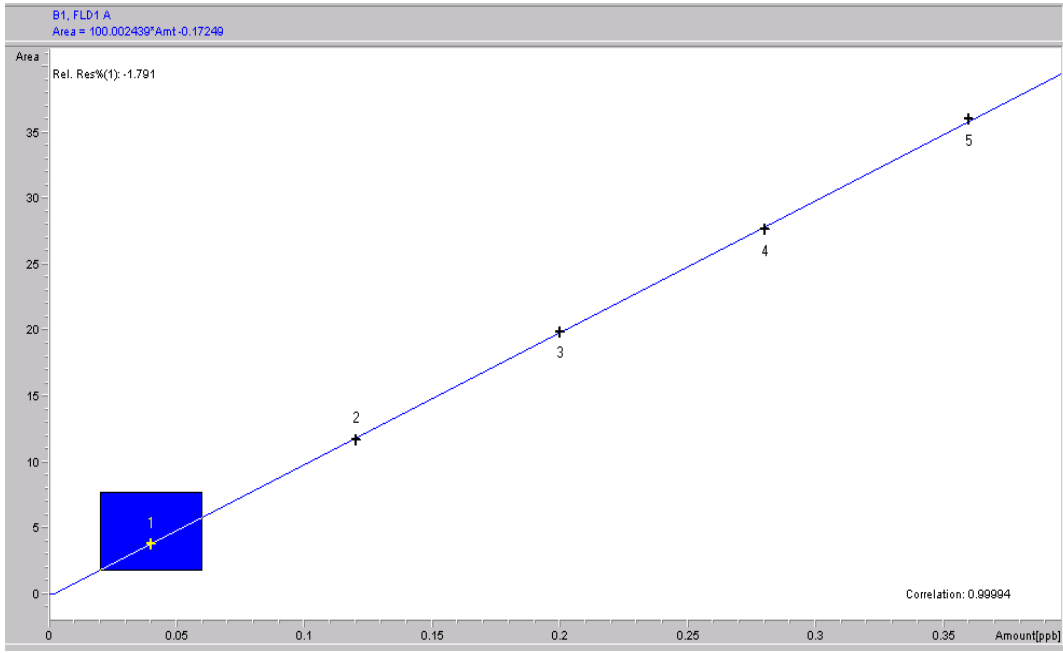
Aflatoksin ara standardı, stok aflatoksin standardından mikropipet ile çekilerek, 1:10 oranında metanolla karıştırılmıştır. Ara standartta, Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ konsantrasyonu sırasıyla 100:30:100:30 ppb dir.

AFB₁ çalışma standardını, beş farklı konsantrasyonda hazırlamak için ara standarttan Çizelge 3.4’te verilen oranlarda alınmıştır. Metanol ve ultra saf su ilave edilerek 10 mL hacme tamamlanmıştır.

Çizelge 3.4 : Aflatoksin B₁ (AFB₁) çalışma standardının hazırlanması.

Vial	Aflatoksin Ara Standardı	Metanol	Ultra Saf Su	AFB ₁ konsantrasyonu
1.	40 µL	3960 µL	6 mL	0,4 ppb
2.	120 µL	3880 µL	6 mL	1,2 ppb
3.	200 µL	3800 µL	6 mL	2,0 ppb
4.	280 µL	3720 µL	6 mL	2,8 ppb
5.	360 µL	3640 µL	6 mL	3,6 ppb

Hazırlanmış olan her bir vialden, HPLC’ye 100 µL’lik enjeksiyonlar yapılmıştır. HPLC okumaları sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi (r=0,9999) Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1: AFB₁ kalibrasyon eğrisi.

3.2.6.2 OTA kalibrasyon eğrisi

OTA stok standardı, -18°C de saklanmış ve analiz öncesinde oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Ana stok konsantrasyonu 29,2 ppm dir.

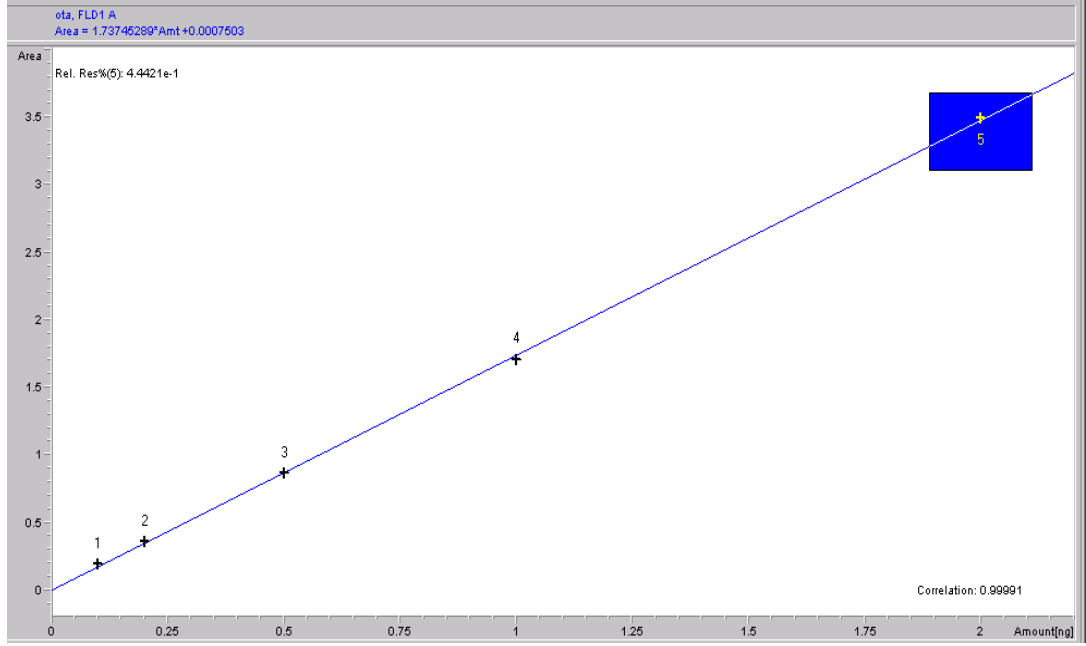
OTA ara standardı, stok OTA standardından mikropipet ile 200 µL çekilerek mobil faz ile 5840 µL'ye tamamlanmak suretiyle 1 ppm konsantrasyonunda OTA ara standardı hazırlanmıştır.

OTA çalışma standardını, beş farklı konsantrasyonda hazırlamak için ara standarttan Çizelge 3.5'te verilen oranlarda alınmıştır. Mobil faz ilave edilerek 10 mL hacme tamamlanmıştır.

Çizelge 3.5 : Okratoksin A (OTA) çalışma standardının hazırlanması.

Vial	OTA Ara Standardı	Mobil Faz	OTA konsantrasyonu
1.	10 µL	9990 µL	1 ppb
2.	20 µL	9980 µL	2 ppb
3.	50 µL	9950 µL	5 ppb
4.	100 µL	9900 µL	10 ppb
5.	200 µL	9800 µL	20 ppb

Hazırlanmış olan her bir vialden, HPLC'ye 100 µL'lik enjeksiyonlar yapılmıştır. HPLC okumaları sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi ($r=0,9999$) Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2: OTA kalibrasyon eğrisi.

3.2.7 Mikotoksin analizleri

Aflatoksin ve OTA analizleri, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.1 Aflatoksin analizi

Aflatoksin tayini, Leontopoulos ve diğ. (2003) tarafından çalışılan metot ile HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. 15 g örnek 30 mL metanol+su (80:20, v/v) solüsyonu ile karıştırılmış ve 10 dak. çalkalanmıştır. Filtrasyon (Millipore, EEC) işlemi uygulanmış ve filtrattan 1 mL alınarak 10 mL distile su ile karıştırılmıştır. Seyreltilmiş filtrat Aflaprep immunoaffinite kolondan (Romer, Avusturya) 6 mL/dak. akış hızında geçirildikten sonra kolon 10 mL distile su ile iki kez yıkanmış ve en son hava geçirilerek kurutulmuştur. Aflatoksinin kolondan elusyonu ve HPLC’de değerlendirilmesi aşamalarında Leontopoulos ve diğ. (2003) tarafından geliştirilen metotta aşağıda belirtilen modifikasyonlar yapılmıştır. Aflatoksinin immunoaffinite kolondan toplanmasında KoBra-Cell (aflatoksin’in türevlendirilmesini sağlamaktadır) ile çalışılan metotlarda uygulanan 1 mL metanol ve 1 mL deiyonize su kullanılmıştır. Aflatoksinin kolondan elüsyonu 0,3 mL/dak. akış hızında gerçekleştirilmiştir. Son eluattan, HPLC’ye 100 µL enjekte edilmiştir. Mobil faz, C₁₈ kolondan 1,0 mL/dak. akış hızında geçirilmiştir. Toksin standardı içeren kontrol (spiked) örnekler (2,0 µg/kg AFB₁), bu metot ile analiz edildiğinde ortalama %75

geri kazanım oranı elde edilmiştir. Aflatoksin B₁ ve aflatoksin G₁ için tayin sınırı (LOD), sırasıyla 0,03 µg/kg ve 0,05 µg/kg'a eşdeğer olarak tahminlenmiştir. Sonuçlar geri kazanım oranına göre düzeltilmemiştir.

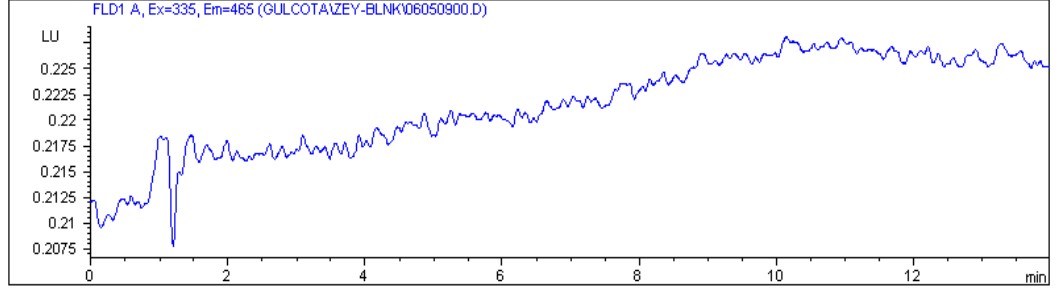
3.2.7.2 OTA analizi

OTA analizleri, Ghitakou ve diğ. (2006) tarafından çalışılan metot ile HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. 15 g örnek 30 mL methanol+su (80:20, v/v) solüsyonu ile karıştırılmış ve 10 dak. çalkalanmıştır. Filtrasyon (Millipore, EEC) işlemi uygulanmış ve filtrattan 2 mL alınarak 40 mL PBS ile seyreltilmiştir. 1 dakika karıştırılmıştır. Seyreltilmiş filtrat, Ochraprep immunoaffinite kolondan (Romer, Avusturya) 2 mL/dak. akış hızı ile geçirilmiştir. Kolon 20 mL distile su ile yıkanmış ve en son hava geçirilerek kurutulmuştur. OTA'nın kolondan elusyonu ve HPLC'de değerlendirilmesi aşamalarında Ghitakou ve diğ. (2006) tarafından geliştirilen metotta aşağıda belirtilen modifikasyonlar yapılmıştır. Son eluatta mobil faz bileşimini sağlayacak şekilde kolondan önce yavaşça 1235 µL asetonitril:asetik asit (40:2) solüsyonu, sonra 1765 µL su geçirilmiş ve bir örnek vial'i içerisinde toplanmıştır. Son eluattan, HPLC'ye 100 µL enjekte edilmiştir. Mobil faz, C₁₈ kolondan 1,0 mL/dak. akış hızında geçirilmiştir. Toksin standardı içeren kontrol (spiked) örnekler (2,0 µg/kg OTA), bu metot ile analiz edildiğinde ortalama %72 geri kazanım oranı elde edilmiştir. Tayin sınırı (LOD), 0,3 µg/kg'a eşdeğer olarak tahminlenmiştir. Sonuçlar geri kazanım oranına göre düzeltilmemiştir.

OTA varlığının doğrulanması, immunoaffinite eluat'a ait örnek ile gerçekleştirilmiştir. Eluat kurutulmuş ve boron trifluorid'in metanolik solüsyonunda çözündürülmüştür. 60°C de 15 dak. ısıtıldıktan sonra HPLC'ye enjekte edilmiştir. OTA pikinin gözden kaybolup, metilester türevinin gözlenmesi ile OTA varlığı doğrulanmıştır.

3.2.7.3 Geri kazanımın hesaplanması ve tayin limiti

Analizi yapılarak AFB₁ ve OTA açısından temiz olduğu belirlenen zeytin örneğinde tespit limiti ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Materyal olarak kullanılan zeytin örneğine ait HPLC kromatogramı Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3 : Kontrol (blank) zeytin örneği HPLC kromatogramı.

AFB₁ ve OTA açısından temiz numune üzerine AFB₁ ve OTA standartlarından 2,0 µg/kg spike işlemi yapılmıştır. % Geri Kazanım aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır **(3.3)**.

$$\%GK = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \quad (3.3)$$

GK= Geri kazanım

C₁= Numunede okunan konsantrasyon

C₂=Numuneye ilave edilen standart konsantrasyonu

Toksin standardı ilavesi (spike) yapılan örnekler AFB₁ ve OTA için belirtilen metotlar ile analiz edildiğinde sırasıyla ortalama %75 ve %72 geri kazanım oranı elde edilmiştir.

Tayin limiti için blank zeytin örneğinde belirlenen sinyal/gürültü oranı baz alınmış olup, sinyal/gürültü oranının 3 katı alınmıştır. AFB₁, AFG₁ve OTA için tayin limiti (LOD), sırasıyla 0,03 µg/kg, 0,05 µg/kg ve 0,3 µg/kg'a eşdeğer olarak tahminlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Aflatoksin ve OTA Tarama Çalışması

İstanbul ve çevresindeki halk pazarlarından 2007 yılında tesadüfi örnekleme yöntemi ile temin edilen sofralık siyah zeytin ve zeytinyağı örneklerinde aflatoksin B₁ (AFB₁) ve okratoksin A (OTA) varlığı incelenmiştir.

4.1.1 Sofralık siyah zeytinde aflatoksin ve OTA

Sofralık siyah zeytin örneklerinde belirlenen AFB₁ ve OTA bulguları Çizelge 4.1’de verilmiştir. İncelenen 30 siyah zeytin örneğinin %96,7’sinde AFB₁ varlığı tespit edilmemiş olup, yalnızca bir örnekte 0,03 µg/kg düzeyinde AFB₁ belirlenmiştir. Ayrıca bir zeytin örneğinde 0,09 µg/kg düzeyinde aflatoksin G₁ bulunmuştur.

Literatürde zeytinin aflatoksin oluşumu için zayıf bir substrat olduğu ve düşük miktarda AFB₁ oluşumunun kafeik asit, kateşin, kumarin ve fenolik bileşenler gibi antimikrobiyal maddelerden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Leontopoulos ve diğ., 2003). Ghitakou ve diğ., (2006) tarafından Yunan orijinli 30 zeytinde yapılan çalışmada örneklerin tamamının (%100) 0,15-1,13 ng/g düzeyinde aflatoksin B₁ içerdiği belirlenmiştir. Fas’ta perakende satış yeri ve süpermarketten temin edilen 10 adet zeytin örneğinde yapılan çalışmada ise 3/10 örnekte 0,5-5,0 µg/kg düzeyinde aflatoksin B₁ tespit edilmiştir (El Adlouni ve diğ., 2006).

Çizelge 4.1 : Sofralık siyah zeytin örneklerinde AFB₁ ve OTA varlığı.

Zeytinde AFB ₁			Zeytinde OTA		
AFB ₁ miktarı (µg/kg)	Örnek sayısı	Oran (%)	OTA miktarı (µg/kg)	Örnek sayısı	Oran (%)
ND	29	96,7	ND	8	26,7
0,03	1	3,3	0,3 - 1,00	15	50,0
			1,00-2,00	5	16,7
			2,01-3,00	2	6,6
Toplam	30	100	Toplam	30	100

ND: Tayin edilmedi (<LOD)

Tarama çalışmasında incelenen 30 siyah zeytin örneğinin %73,3'ünün 0,54-2,99 µg/kg aralığında OTA içerdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Yunan orijinli 30 zeytin örneğinde gerçekleştirilen bir çalışmada, OTA miktarı 2 örnekte 1,18 ve 1,86 µg/kg düzeyinde bulunmuştur (Ghitakou ve diğ., 2006). Fas'ta perakende satış yeri ve süpermarketten temin edilen 10 adet zeytin örneğinde yapılan çalışmada 6/10 örnekte 0,31-1,02 µg/kg düzeyinde OTA belirlenmiştir (El Adlouni ve diğ., 2006). Bu durumda örneklerimizdeki OTA kontaminasyonunun sıklıkla bulunduğu söylenebilir. Çizelge 4.2'de sofralık siyah zeytin örneklerinde yapılan OTA bulguları verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Sofralık siyah zeytin örneklerinin OTA miktarı (µg/kg).

Örnek No	OTA miktarı (µg/kg)	Örnek No	OTA miktarı (µg/kg)
1	ND	16	1,27
2	0,56	17	2,37
3	0,88	18	ND
4	0,98	19	0,75
5	0,94	20	0,79
6	0,88	21	ND
7	0,87	22	ND
8	0,88	23	0,87
9	0,88	24	0,78
10	0,84	25	0,54
11	0,90	26	ND
12	1,15	27	2,99
13	1,84	28	ND
14	1,65	29	ND
15	1,87	30	ND

ND: Tayin edilmedi (<LOD)

İncelenen sofralık siyah zeytin örneklerinde OTA'nın sıklıkla bulunduğu görülmüştür. Bir zeytin örneğinde (örnek no:3) OTA (0,88 µg/kg) ve AFB₁ (0,03 µg/kg) in, bir diğer zeytin örneğinde de (örnek no:14) OTA (1,65 µg/kg) ve aflatoksin G₁ (0,09 µg/kg) in birlikte bulunduğu belirlenmiştir. Fas'ta perakende satış yeri ve süpermarketten temin edilen 10 adet zeytin örneğinde yapılan çalışmada 3/10 örnekte de aflatoksin ve OTA birlikte bulunmuştur (El Adlouni ve diğ., 2006).

4.1.2 Zeytinyağında aflatoksin ve OTA

Zeytinyağı örneklerinde belirlenen AFB₁ ve OTA bulguları Çizelge 4.3'te verilmiştir. İncelenen 30 zeytinyağı örneğinin yalnızca bir adedinde 0,03 µg/kg düzeyinde AFB₁ belirlenmiştir. Yunan ve İspanyol orijinli zeytinyağlarda yapılan bir çalışmada 5-10 µg/kg düzeyinde AFB₁ tespit edilmiştir (Toussaint ve diğ., 1997). Yunan orijinli 50 zeytinyağı örneğinde AFB₁'in incelendiği bir başka çalışmada, iki farklı analiz metodu kullanılmıştır. Uygulanan metotlardan birinde AFB₁ tespit edilemezken, düşük tayin limitli diğer metotta örneklerin %72'sinde düşük miktarlarda AFB₁ (0,0028-0,0463 µg/kg) varlığı belirlenmiştir (Daradimos ve diğ., 2000).

Çizelge 4.3 : Zeytinyağı örneklerinde AFB₁ ve OTA varlığı.

Zeytinyağında AFB ₁			Zeytinyağında OTA		
AFB ₁ miktarı (µg/kg)	Örnek sayısı	Oran (%)	OTA miktarı (µg/kg)	Örnek sayısı	Oran (%)
ND	29	96,7	ND	5	16,7
0,03	1	3,3	0,3-1,00	10	33,3
			1,00-2,00	14	46,7
			2,01-3,00	1	3,3
Toplam	30	100	Toplam	30	100

ND:Tayin edilmedi (<LOD)

Tarama çalışmamızda zeytinyağı örnekleri OTA varlığı açısından incelendiğinde, OTA kontaminasyonunun siyah zeytine benzer şekilde yaygın olduğu tespit edilmiştir.

İncelenen 30 zeytinyağı örneğinin 10 adedinde 0,36-0,98 µg/kg, 14 adedinde 1,00-2,00 µg/kg ve 1 adedinde de 2,10 µg/kg düzeyinde OTA belirlenmiştir. Zeytinyağı örneklerinde OTA varlığının, OTA ile kontamine zeytinlerdeki toksinin zeytinyağlarına geçmesi ile ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Zeytinyağı örneklerinde yapılan OTA analiz bulguları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 : Zeytinyağı örneklerinde OTA miktarı (µg/kg).

Örnek No	OTA miktarı (µg/kg)	Örnek No	OTA miktarı (µg/kg)
1	0,50	16	1,63
2	1,56	17	0,77
3	0,42	18	1,55
4	0,61	19	1,58
5	1,59	20	1,63
6	1,61	21	ND
7	1,55	22	ND
8	1,23	23	0,48
9	2,10	24	0,36
10	1,26	25	ND
11	1,29	26	0,54
12	1,26	27	0,98
13	1,09	28	0,66
14	1,08	29	ND
15	0,55	30	ND

ND: Tayin edilmedi (<LOD)

İncelenen 30 zeytinyağı örneğinin 25 adedinde OTA bulunmuştur. OTA miktarı 0,36 µg/kg-2,10µg/kg arasındadır. Bir zeytinyağı örneğinde (örnek no:24) OTA (0,36 µg/kg) ve AFB₁ (0,03 µg/kg) in birlikte bulunduğu belirlenmiştir.

Finoli ve diğ., (2005) tarafından yapılan çalışmada Sicilya’da üretilen zeytinyağı ve zeytinden oluşan toplam 45 adet örnek aflatoksin ve okratoksin A varlığı açısından incelenmiştir. Zeytinyağı örneklerinin %46’sında (6-40 ng/kg aflatoksin ve 52-244 ng/kg OTA) ve zeytin örneklerinin %67’sinde (31-1518 ng/kg aflatoksin ve 101-8391 ng/kg OTA) bu mikotoksinler belirlenmiştir. Ayrıca, 1 adet zeytinyağı ve 6 adet zeytin örneğinde aflatoksin ve okratoksin A’nın birlikte bulunduğu bildirilmiştir.

Son çalışmalar, zeytinde toksijenik küf sporlarının (*Aspergillus*) mevcudiyetini ve AFB₁ ve OTA oluşumunu göstermektedir. Zeytinyağında bulunan aflatoksin ve OTA’nın kontamine zeytinlerin işlenmesinden ileri geldiği düşünülmektedir. İspanyol zeytinyağlarında aflatoksin varlığı daha önceden yapılmış çalışmada bildirilmiştir (Toussaint ve diğ., 1997). OTA ise Fas’ta (Leontopoulos ve diğ., 2003) ve son olarak Yunan orijinli zeytinyağlarında belirlenmiştir (Papachristou ve Markaki, 2004; Roussos ve diğ., 2006).

Literatürde zeytin mikroflorasında siyah *Aspergilli*’lerin ve *Penicillium* türlerinin izole edildiği belirtilmektedir. Tarama çalışmamızda incelenen zeytin ve zeytinyağı

örneklerinde yaygın bir şekilde OTA varlığının belirlenmesi üzerine, çalışmanın devamında sofralık siyah zeytinde OTA oluşumuna iki farklı cinse ait OTA üreticisi küfün ve sıcaklığın etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Aşılama çalışmasında kullanılmak üzere siyah Aspergilli'leri temsilen *Aspergillus carbonarius* ve *Penicillium*'ları temsilen *Penicillium verrucosum* küf türleri seçilmiştir. Sofralık siyah zeytinde *A. carbonarius* ve *P. verrucosum* tarafından OTA oluşumuna sıcaklık (10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C) etkisi 21 günlük inkübasyon süresince incelenmiştir.

4.2 Kimyasal Analizler

A. carbonarius ve *P. verrucosum* ile aşılama çalışmasında kullanılan sofralık siyah zeytinin bileşimini belirlemek amacıyla yapılan kimyasal analizlere ait bulgular Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5 : Sofralık siyah zeytinin bileşimi.

Zeytinin Bileşimi	Miktar (%)
Nem	54,9
Yağ	30,3
Protein	0,9
Kül	5,8
Karbonhidrat	8,1
pH	5,4
Tuz	1,6
Asitlik	0,4

Aşılama çalışmasında kullanılan sofralık siyah zeytinde belirlenen yağ asidi kompozisyonu Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6 : Sofralık siyah zeytin örneklerinin yağ asidi kompozisyonu.

Yağ Asidi	Miktar (%)
Myristik	0,03
Palmitik	12,34
Palmitoleik	1,31
Margarik	0,10
Heptadesenoik	0,24
Stearik	0,53
Oleik	73,72
Linoleik	9,06
Araşidik	0,34
Gadoleik	0,21
Alfa-Linolenik	0,57
Ekosenoik	0,04
Behenik	0,14
Dihomo-Gamma Linolenik	0,70
Arakidonik	0,68
Toplam	100

4.3 Sofralık Siyah Zeytinde Aşılama Çalışması

4.3.1 *A. carbonarius* tarafından farklı sıcaklıklarda OTA oluşumu

Doğada yaygın bir şekilde bulunan siyah *Aspergilli*'lerin tümü yakın zamana kadar *A. niger* olarak tanımlanmaktaydı. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise siyah renkli *Aspergillus* grubu içerisinde farklı türlerin olduğu belirlenmiştir. *A. carbonarius* mikroskobik olarak koloni büyüklüğü ve gen diziliminden ayırt edilebilmektedir (Cabañes ve diğ., 2002). Çalışmamızda siyah *Aspergilli*'leri temsilen OTA oluşumundan asıl olarak sorumlu olan *A. carbonarius* seçilmiştir.

Çalışmamızda *A. carbonarius* ile aşılanan ezme halindeki zeytin örnekleri; 0,92 a_w değerinde, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C sıcaklık derecelerinde 21 gün süresince inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla OTA tayini yapılmıştır.

Sofralık siyah zeytin örneklerinde inkübasyon süresince belirlenen OTA miktarları Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 : Sofralık siyah zeytinde *A. carbonarius* tarafından OTA oluşumu.

Gün	OTA oluşumu (µg/kg) ^a						
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
1	ND	41,66	41,51	43,94	48,33	23,91	ND
3	ND	54,54	24,82	25,00	27,89	35,00	ND
5	ND	50,15	14,21	14,33	13,03	32,42	ND
7	ND	51,51	9,62	11,70	7,51	23,18	ND
14	ND	44,09	41,81	40,45	37,12	49,24	ND
21	ND	46,21	1,00	8,91	0,60	10,39	ND

^a: İki tekrarın ortalaması

ND: Tayin edilmedi (<LOD)

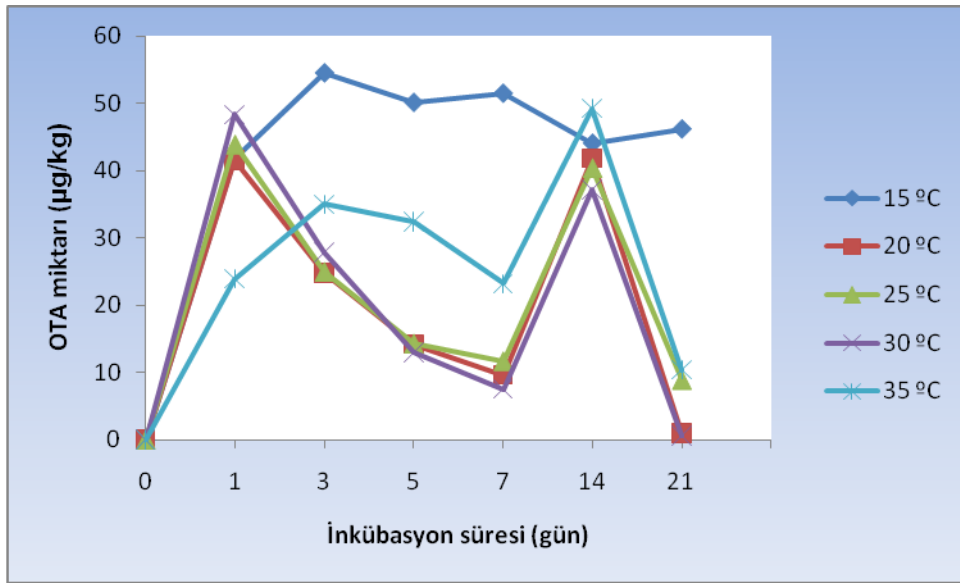
10°C ve 40°C de 21 günlük inkübasyon süresince sofralık siyah zeytin ezmesi örneklerinde, küf gelişimi ve OTA oluşumu belirlenmemiştir. Kapetanakou ve diğ. (2009) tarafından da *A. carbonarius*’un MEA besiyeri ortamında 10°C ve 40°C de OTA oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bu açıdan bulgumuz literatür verileri ile uyumludur.

Maksimum OTA akümülyasyonunun (54,54 µg/kg düzeyinde), test edilen sıcaklık derecelerinden 15°C de ve inkübasyonun 3. gününde gerçekleştiği belirlenmiştir. Benzer şekilde *A. carbonarius*’un farklı nem içeriğine sahip fıstıklarda 15°C de maksimum miktarda (4-52 µg/kg) OTA oluşturduğu bildirilmiştir (Marín ve diğ., 2008). Ancak, literatürde 0,85 a_w değerinin altında *A. carbonarius* gelişiminin gözlenmediği, 15°C de gelişimin sadece yüksek a_w değerlerinde (0,92 ve 0,95) gerçekleştiği belirtilmektedir (Romero ve diğ., 2007).

Ayrıca, *A. carbonarius*’un üzümde 30-35°C ve 0,96 a_w de optimum gelişim gösterdiği, maksimum OTA oluşumunun ise 15-20°C de 0,93-0,96 a_w değerlerinde (Tassou ve diğ., 2007) ve 20°C de gözlemlendiği bildirilmiştir (Bellí ve diğ., 2006a; Valero ve diğ., 2006). İspanya ve Tunus’ta üzümlerden izole edilmiş olan *A. carbonarius* ile yapılan çalışmada, üzüm benzeri besiyeri ortamı kullanılmıştır. Gelişim ve OTA oluşumu 20°C de en fazla olmuştur (Marín ve diğ., 2006).

Sofralık siyah zeytin örneklerinde OTA miktarı, 15°C de inkübasyonun 3. gününde maksimum değere ulaştıktan sonra miktarda hafif bir dalgalanma gözlenmiştir. Ancak OTA miktarında çok keskin bir artış ya da azalma olmamıştır. Valero ve diğ. (2006) tarafından synthetic nutrient medium'da (SNM) yapılan çalışmada da *A. carbonarius* tarafından oluşturulan OTA akümülyasyonunun inkübasyonun ilk gününde başladığı ancak, maksimum akümülyasyonun 4. ve 7. günler arasında olduğu bildirilmiştir.

Sofralık siyah zeytin örneklerinde *A. carbonarius* tarafından OTA oluşumuna sıcaklık etkisi Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 : Sofralık siyah zeytinde *A. carbonarius* tarafından farklı sıcaklıklarda OTA oluşumu.

15°C de inkübe edilen sofralık zeytin örneklerinde maksimum OTA akümülyasyonu inkübasyonun 3. gününde 54,54 µg/kg olarak belirlenmiştir. 20, 25 ve 30°C de inkübasyonun ilk gününde belirlenen OTA miktarları birbirine çok yakın olup, sırasıyla 41,51; 43,94 ve en yüksek 30°C de 48,33 µg/kg dır. 35°C de inkübasyonun ilk gününde OTA oluşumunun diğer sıcaklık derecelerine göre daha az olduğu ve inkübasyonun 3. gününde 35,00 µg/kg değerine ulaştığı gözlenmiştir. 20, 25 ve 30°C de inkübasyonun ilk gününde belirlenen OTA miktarları inkübasyonun 7. gününe kadar azalan bir kinetik göstermiştir. OTA miktarı, 30°C de inkübasyonun 7. gününde 7,51 µg/kg düzeyine kadar düşmüştür. 35°C de inkübasyonda ise 15°C dekiye benzer şekilde inkübasyonun üçüncü gününe kadar OTA miktarında artma, sonrasında azalma gözlenmiştir. 20-35°C sıcaklık dereceleri arasında inkübasyonda

7. günden sonra OTA akümülyasyonunda hızlı bir artış gözlenmiş ve 20, 25 ve 30°C de inkübasyonun 14. gününde OTA miktarı yaklaşık olarak ilk günde belirlenen değerlere yükselmiştir. İnkübasyonun 14. gününden itibaren OTA miktarı azalma sürecine girmiş ve 30°C de inkübasyonun 21. gününde 0,60 µg/kg minimum değeri tespit edilmiştir. OTA miktarındaki azalmaların molekülün fungal degradasyonu ile yani küfün metabolik faaliyetinin devamı için toksini alternatif karbon kaynağı olarak kullanması sonucu olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca, *A. carbonarius*'un karboksipeptidaz enzimi ile OTA'yı okratoksin α gibi diğer ürünlere parçalayabildiği de bildirilmektedir (Valero ve diğ., 2006).

15°C de 21 günlük inkübasyon süresince belirlenen OTA miktarları, istatistiki ($p<0,05$) olarak da diğer sıcaklık derecelerindeki verilerden önemli bir şekilde farklı bulunmuştur. 20, 25, 30 ve 35°C de belirlenen OTA miktarları arasında ise Duncan'ın Çoklu Aralık Testine göre istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığı belirlenmiştir. *A. carbonarius* ile aşıl原因an sofralık siyah zeytin örneklerinin 20-35°C sıcaklık dereceleri arasında 21 günlük inkübasyonu süresince belirlenen OTA miktarları 15°C de belirlenen değerlerden daha düşüktür. Leong ve diğ. (2006), sentetik üzüm suyu besiyerinde (SGM) 0,92 su aktivitesi (a_w) değerinde, 15°C nin üzerindeki inkübasyon sıcaklıklarında ve Marín ve diğ. (2008) farklı nem içeriğine sahip fıstıklarda 20°C nin üzerindeki sıcaklıklarda *A. carbonarius* tarafından oluşturulan OTA miktarında hızlı degradasyon gerçekleştiğini bildirmektedir. 35°C hariç 20, 25 ve 30°C deki bulgularımız literatür ile uyumluluk göstermektedir.

İncelenen inkübasyon sıcaklıklarından 15, 20, 25, 30 ve 35°C de, OTA oluşumunun ilk günden başlaması dikkat çekmektedir. Literatürde benzer bulgulara rastlanmış olup, *A. carbonarius*'un OTA üreten diğer türlerden farklı olarak konidyal çimlenmeden sadece birkaç saat sonra küf sporlarında akümüle olmuş olan OTA'yı ortama salgıladığı belirtilmektedir (Atoui ve diğ., 2007a).

Sentetik üzüm suyu besiyerinde (SGM) yapılan bir çalışmada, 15°C ve 0,92 a_w değerinde *A. carbonarius* izolatlarının küçük kolonileri tarafından OTA oluşumu belirlenmiştir. Bu durum OTA oluşumunun, küf gelişiminin erken safhasında gerçekleştiğini yani toksinin yalnızca sabit fazda sekonder metabolit olarak değil, aynı zamanda aktif hif gelişimi esnasında oluştuğunu göstermektedir (Leong ve diğ., 2006).

4.3.2 *P. verrucosum* tarafından farklı sıcaklıklarda OTA oluşumu

P. verrucosum, yaygın bir şekilde hububatlardan (Lindblad ve diğ., 2004; Elmholt ve Rasmussen, 2005) izole edilmektedir. Heperkan ve diğ. (2006) tarafından siyah zeytinden de izole edilmiştir. *P. verrucosum* izolatları YES ve CYA besi ortamlarında 25°C de 7 gün inkübe edildiğinde, izolatların en az % 66'sının OTA oluşturduğu belirtilmektedir (Frisvad ve diğ., 2005). *P. verrucosum*'un düşük a_w değerlerinde dahi OTA oluşturabildiği bildirilmektedir. Lag faz üzerine a_w 'nin etkisi sıcaklıktaki azalma ile artmaktadır. 20-30°C de spor germinasyonu 0,80 a_w değerinde gerçekleşirken, 10°C de germinasyon için gerekli minimum a_w değeri 0,85 olarak belirtilmektedir (Pardo ve diğ., 2006a).

Çalışmamızda *P. verrucosum* ile aşılanan zeytin ezmesi örnekleri; 0,92 a_w değeri ve yedi farklı sıcaklık derecesinde (10-40°C) 21 gün inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla OTA tayini yapılmıştır. İnkübasyon süresince belirlenen OTA miktarları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8 : Sofralık siyah zeytinde *P. verrucosum* tarafından OTA oluşumu.

Gün	OTA oluşumu ($\mu\text{g/kg}$) ^a						
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
1	ND	4,59	7,33	8,00	7,04	2,10	ND
3	7,64	6,58	7,36	7,68	6,51	ND	ND
5	3,33	7,75	7,85	7,45	7,50	1,09	ND
7	ND	4,21	6,59	7,48	5,90	ND	ND
14	3,15	4,97	5,72	5,42	7,54	ND	ND
21	2,73	3,80	5,36	6,24	6,38	ND	ND

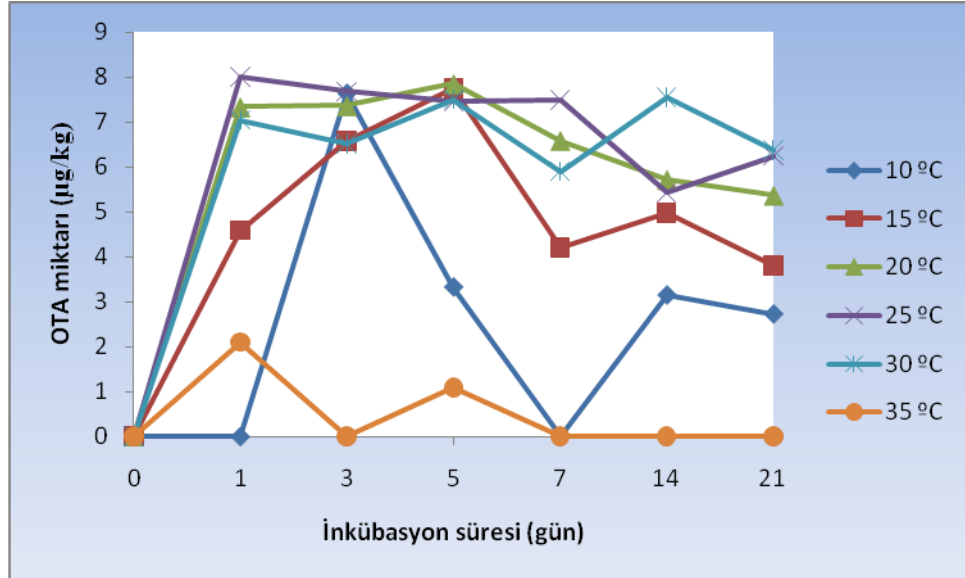
^a: İki tekrarın ortalaması

ND: Tayin edilmedi (<LOD)

Sofralık zeytin örneklerinde 10°C de, inkübasyonun ilk gününde OTA oluşumu belirlenmemiştir. İnkübasyonun 3. gününde OTA miktarı, 7,64 $\mu\text{g/kg}$ değerine yükselmiştir. Daha sonra azalma sürecine girmiş ve 7. günde OTA oluşumu belirlenmemiştir. 14. ve 21. günlerde ise sırasıyla 3,15 $\mu\text{g/kg}$ ve 2,73 $\mu\text{g/kg}$ değerleri belirlenmiştir.

40°C de 21 günlük inkübasyon süresince sofralık siyah zeytin ezmesi örneklerinde, küf gelişimi ve OTA oluşumu belirlenmemiştir. Literatürde *P. verrucosum* gelişimi için 0-31°C sıcaklık aralığı belirtilmektedir (Pitt and Hocking, 1997).

Çalışmamızda 15°C de OTA akümülayonunun 20, 25 ve 30°C deki değerlerden daha az olduğu belirlenmiştir. 15°C de inkübasyonun 5. gününe kadar OTA miktarında sürekli bir artış, sonrasında azalma gözlenmiştir. 15°C de OTA miktarı 5. günde 7,75 µg/kg maksimum değerine yükselmiş, sonrasında sürekli azalma eğilimi göstererek 21. günde 3,80 µg/kg minimum değerine inmiştir. 35°C de ise sadece inkübasyonun 1. ve 5. günlerinde sırasıyla 2,10 ve 1,09 µg/kg gibi çok düşük miktarlarda OTA akümülayonu belirlenmiş, inkübasyonun diğer günlerinde OTA tespit edilmemiştir. Sofralık siyah zeytin örneklerinde *P. verrucosum* tarafından OTA oluşumuna sıcaklık etkisi Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 : Sofralık siyah zeytinde *P. verrucosum* tarafından farklı sıcaklıklarda OTA oluşumu.

20, 25 ve 30°C de inkübe edilen örneklerde, inkübasyonun birinci gününde belirlenen OTA miktarları birbirine çok yakın olup, sırasıyla 7,33 µg/kg, 8,00 µg/kg ve 7,04 µg/kg dır. 15, 20, 25 ve 30°C de elde edilen veriler arasında istatistiki ($p>0,05$) olarak önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Literatürde *P. verrucosum* gelişimi için optimum sıcaklık değeri 20°C (Pardo ve diğ., 2006b), OTA oluşumu için ise 0,90-0,98 a_w aralığında 25°C olarak belirtilmektedir (Murphy ve diğ., 2006).

20-30°C sıcaklık derecelerinde inkübasyonun ilk gününde akümüle olan OTA, 3. günde hafif bir dalgalanma göstermekte, inkübasyonun 5. gününe kadar hemen hemen sabit miktarda kalmaktadır. İnkübasyon sürecinin devamında OTA miktarı azalma eğilimi göstermekte olup, sadece 30°C de inkübasyonun 14. gününde ve 25°C de inkübasyonun 21. gününde OTA miktarında hafif bir artma gözlenmiştir.

Ezme halindeki zeytin örneklerinde *P. verrucosum* tarafından OTA oluşumuna etkisi incelenen sıcaklık derecelerinden 15, 20, 25, 30 ve 35°C de OTA akümülyasyonu, *A. carbonarius* ile aşıl原因 örneklerdekine benzer şekilde inkübasyonun ilk gününde başlamıştır. Literatürde inkübasyonun ilk gününde belirlenen OTA akümülyasyonunun, toksin oluşumu ile değil örneklere aşıl原因 küf sporlarından ortama OTA difüzyonu ile gerçekleştiği belirtilmektedir (Valero ve diğ., 2006).

P. verrucosum ile aşıl原因 zeytin ezmesi örneklerinin 21 günlük inkübasyonu süresince OTA miktarında dalgalanmalar gözlenmiştir. OTA'nın stabil bir molekül olması nedeniyle doğal olarak dekompoze olmadığı (Leong ve diğ., 2006), miktardaki azalmaların molekülün fungal degradasyonu ile yani küfün metabolik faaliyetinin devamı için toksini alternatif karbon kaynağı olarak kullanması sonucu olabileceği belirtilmektedir (Valero ve diğ., 2006).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ilk olarak İstanbul ve çevresinde piyasadan temin edilen 30 zeytin ve 30 zeytinyağı örneği Aflatoksin ve OTA mevcudiyeti açısından incelenmiştir. Çalışma sonucunda analiz edilen sofralık siyah zeytin ve zeytinyağı örneklerinin yalnızca birer tanesinde çok düşük düzeyle aflatoksin B₁ (AFB₁) belirlenmiş olup, sofralık siyah zeytinin AFB₁ oluşumu açısından zayıf bir substrat olduğu görüşü bulgumuz ile de desteklenmiştir.

Buna karşılık, sofralık siyah zeytin örneklerinin %73,3'ünün 0,54-2,99 µg/kg düzeyinde ve zeytinyağı örneklerinin %83,3'ünün 0,36-2,10 µg/kg düzeyinde OTA içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, bir zeytin ve bir zeytinyağı örneğinde AFB₁ ve OTA'nın birlikte bulunduğu gözlenmiştir. Bir zeytin örneğinde de 0,03 µg/kg aflatoksin G₁ in OTA ile birlikte bulunduğu belirlenmiştir.

OTA'nın örneklerde yaygın bir şekilde bulunması üzerine 2 farklı küf türü, *Aspergillus carbonarius* ve *Penicillium verrucosum* un siyah zeytinde OTA oluşumundaki rolü incelenmiştir. *A. carbonarius* ve *P. verrucosum* küf türleri, sofralık siyah zeytinden hazırlanan zeytin ezmesine aşılanmış ve örnekler 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40 °C sıcaklık derecelerinde 21 gün süre ile inkübe edilmiştir.

Sofralık siyah zeytinde *A. carbonarius* tarafından maksimum OTA oluşumu, test edilen inkübasyon sıcaklıklarından 15°C de inkübasyonun 3. gününde belirlenmiştir. 10°C ve 40°C de 21 günlük inkübasyon süresince zeytin örneklerinde, küf gelişimi ve OTA oluşumu belirlenmemiştir. 20, 25, 30 ve 35°C de belirlenen OTA miktarları arasında ise Duncan'ın Çoklu Aralık Testine göre istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığı belirlenmiştir.

P. verrucosum'un 20, 25, 30°C de oluşturduğu OTA miktarları birbirine çok yakın bulunmuştur. Bu sıcaklıklarda elde edilen veriler arasında istatistiki ($p>0,05$) olarak önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. OTA'nın 10 ve 15°C de 20°C den daha düşük miktarlarda, 35°C de ise sadece 1. ve 5. günlerde sırasıyla 2,10 ve 1,09 µg/kg

gibi çok düşük miktarlarda olduğu belirlenmiştir. 40°C de 21 günlük inkübasyon süresince küf gelişimi ve OTA oluşumu belirlenmemiştir.

A. carbonarius ve *P. verrucosum* ile aşıl原因an zeytin ezmesi örneklerinin 21 günlük inkübasyonu süresince OTA miktarında dalgalanmalar gözlenmiştir. OTA'nın stabil bir molekül olması nedeniyle doğal olarak dekompoze olmadığı (Leong ve diğ., 2006), miktardaki azalmaların molekülün fungal degradasyonu ile yani küfün metabolik faaliyetinin devamı için toksini alternatif karbon kaynağı olarak kullanması sonucu olabileceğı belirtilmektedir. Ayrıca, *A. carbonarius*'un karboksipeptidaz enzimi ile OTA'yı okratoksin α gibi diğeri ürünlere parçalayabildiğı de bildirilmektedir (Valero ve diğ., 2006).

P. verrucosum ile aşıl原因an zeytin ezmesi örneklerinde tüm inkübasyon sıcaklık ve süreleri için belirlenen OTA miktarları, *A. carbonarius* ile aşıl原因an örneklerde belirlenen değerlerden çok daha azdır. *A. carbonarius*, *P. verrucosum*' a göre zeytinde yaklaşık olarak 8-10 kat daha fazla OTA oluşturmaktadır. Mikotoksin oluşumunun, substrat üzerindeki gelişime ve çevresel koşullara bağı olduğı bilinmektedir. Gerçekleştirilen çalışmada her iki küf türü içinde aynı çevre koşulları sağlandığından, *P. verrucosum* tarafından yüksek miktarlarda OTA oluşturulması için sofralık siyah zeytinin zayıf bir substrat özelliğı gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda ayrıca, *A. carbonarius*'un zeytinde OTA oluşturduğu optimum sıcaklık değeri ilk defa belirlenmiştir.

Zeytinde küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunun önlenmesi için üretim esnasında sıcaklık ve su aktivitesi gibi çevresel faktörler dikkate alınmalıdır. Klasik yöntemle zeytin üretiminin yerini modern yöntemler almalıdır. Zeytinin hasatından, işlenip tüketilinceye kadar geçen sürede küf gelişimini önleyici koşullar sağlanmalı ve üreticiler bu konuda bilinçlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahhab, M. A., Abdel-Galil, M. M., and El-Lithey, M.,** 2005. Melatonin Counteracts Oxidative Stress in Rats Fed An Ochratoxin A Contaminated Diet, *Journal of Pineal Research*, Vol. **38**, no. 2, pp. 130-135.
- Abdel-Wahhab, M. A., Ahmed, H. H., and Hagazi, M. M.,** 2006. Prevention of aflatoxin B₁-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts, *Journal of Applied Toxicology*, Vol. **26**, no. 3, pp. 229-238.
- Abramson, D., Hulasare, R., White, N. D. G., Jayas, D. S., and Marquardt, R. R.,** 1999. Mycotoxin formation in hullless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content, *Journal of Stored Products Research*, **35**, 297-305.
- Adav, S. S., and Govindwar, S. P.,** 1997. Effects of aflatoxin B₁ on liver microsomal enzymes in different strains of chickens, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, Vol. **118**, no. 2, pp. 185-189.
- Aktan, N., ve Kalkan, H.,** 2000. *Sofralık Zeytin Teknolojisi*, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.
- Aldred, D., Cairns-Fuller, V., and Magan, N.,** 2008. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain, *Journal of Stored Products Research*, **44**, 341-346.
- Almeida, A. P., Alaburda, J., Shundo, L., Ruvieri, V., Navas, S. A., Lamardo, L. C. A., and Sabino, M.,** 2007. Ochratoxin A in Brazillian Instant Coffee, *Brazillian Journal of Microbiology*, **38**, 300-303.
- AOAC,** 2000. *Official methods of Analysis of AOAC International* (17th ed., Vol I). Gaithersburg, Maryland, USA.
- Arroyo, M., Aldred, D., and Magan, N.,** 2005. Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread, *International Journal of Food Microbiology*, **98**, 223-231.
- Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Segovia-Bravo, K. A., García-García, P., Durán-Quintana, M. C., Romero, C., Rodríguez-Gómez, F., and Garrido-Fernández, A.,** 2009. Instability profile of fresh packed "seasoned" Manzanilla-Aloreña table olives, *Food Science and Technology*, **42**, 1629-1639.

- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., and Garrido-Fernández, A.,** 2008. Role of yeasts in table olive production, *International Journal of Food Microbiology*, **128**, 189-196.
- Atasayar-Sabuncuoğlu, S., Baydar, T., Giray, B., ve Şahin, G.,** 2008. Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, Cilt **28**, Sayı 1, s. 63-92.
- Atoui, A., Dao, H. P., Mathieu, F., and Lebrihi, A.,** 2006. Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* ve *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A, *Molecular Nutrition & Food Research*, **50**, 488-493.
- Atoui, A., Mitchell, D., Mathieu, F., Magan, N., and Lebrihi, A.,** 2007a. Partitioning of ochratoxin A in mycelium and conidia of *Aspergillus carbonarius* and the impact on toxin contamination of grapes and wine, *Journal of Applied Microbiology*, **103**, 961-968.
- Atoui, A., Mathieu, F., and Lebrihi, A.,** 2007b. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR, *International Journal of Food Microbiology*, **115**, 313-318.
- Bakker, M., and Pieters, M. N.,** 2002. Risk Assessment of Ochratoxin A in the Netherlands, *RIVM Report*, **388802025**, Bilthoven, BA.
- Balasaheb Wangikar, P., Sinha, N., Dwivedi, P., and Sharma, A. K.,** 2007. Teratogenic Effects of Ochratoxin A and Aflatoxin B₁ Alone and in Combination on Post-Implantation Rat Embryos in Culture, *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, Vol. **8**, no. 4, pp. 357-364.
- Barišić, K., Rumora, L., Petrik, J., Čepelak, I., and Žanić-Grubišić, T.,** 2005. Ochratoxin A Induces Apoptosis in LLC-PK1 Cells via JNK and p38 MAPK Activation, *Croatica Chemica Acta*, Vol. **78**, no. 3, pp. 385-392.
- Basmacıoğlu, H. ve Ergül, M.,** 2003. Yemlerde Bulunan Toksinler ve Kontrol Yolları, *Hayvansal Üretim*, Cilt **44**, Sayı 1, s. 9-17.
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Sijva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., and Schwan, R. F.,** 2009. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods, *Food Control*, **20**, 784-790.
- Bavaresco, L., Vezzulli, S., Civardi, S., Gatti, M., Battilani, P., Pietri, A., and Ferrari, F.,** 2008. Effect of Lime-Induced Leaf Chlorosis on Ochratoxin A, *trans*-Resveratrol, and ϵ -Viniferin Production in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Berries Infected by *Aspergillus carbonarius*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2085-2089.
- Begum, F., and Samajpati, N.,** 2000. Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds, *Naturwissenschaften*, **87**, 275-277.

- Bellí, N., Marín, S., Coronas, I., Sanchis, V., and Ramos, A. J.,** 2007. Skin damage, high temperature and relative humidity as detrimental factors for *Aspergillus carbonarius* infection and ochratoxin A production in grapes, *Food Control*, **18**, 1343-1349.
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., and Ramos, A. J.,** 2006a. Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes, *Food Additives and Contaminants*, Vol. **23**, no. 10, pp. 1021-1029.
- Bellí, N., Ramos, A. J., Sanchis, V., and Marín, S.,** 2006b. Effect of photoperiod and day-night temperatures simulating field conditions on growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes, *Food Microbiology*, **23**, 622-627.
- Bevilacqua, A., Perricone, M., Cannarsi, M., Corbo, M. R., and Sinigaglia, M.,** 2009. Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Belle Di Cerignola table olives, *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 2198-2207.
- Boselli, E., Di Lecce, G., Strabbioli, R., Pieralisi, G., and Frega, N. G.,** 2009. Are virgin olive oils obtained below 27°C better than those produced at higher temperatures?, *Food Science and Technology*, **42**, 748-757.
- Boskou, D.,** 2006. Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit. In *Olive Oil: Chemistry and Technology* (2nd Ed., pp. 13-19). AOCS Press.
- Boskou, D.,** 2009. Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil. In *Olive oil: Minor Constituents and Health* (pp. 11-44). Taylor&Francis Group, LLC.
- Bottalico, A., and Logrieco, A.,** 2008. Mycotoxins in *Alternaria alternata*-infected olive fruits and their possible transfer into oil, *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin*. Vol. **23**, no. 3, pp. 473-479.
- Bryden, W. L., Cumming R. B., and Lloyd A. B.,** 1980. Sex and strain responses to aflatoxin B₁ in the chicken, *Avian Pathology*, **9**, 539-550.
- Cabañas, R., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellà, G., and Cabañes, F. J.,** 2008. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market, *Food Microbiology*, **25**, 642-647.
- Cabañes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellà, G., Minguez, S., and Pons, A.,** 2002. What is the source of ochratoxin A in wine?, *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 213-215.
- Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., and Keast, R. S. J.,** 2009. Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **49**, 218-236.
- Comerio, R., Pinto, V. E. F., and Vaamonde, G.,** 1998. Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat, *International Journal of Food Microbiology*, **42**, 219-223.
- Cvetnić, Z., and Pepeljnjak, S.,** 1997. Distribution and Mycotoxin-Producing Ability of Some Fungal Isolates from the Air, *Atmospheric Environment*, Vol. **31**, no. 3, pp. 491-495.

- Daradimos, E., Marcaki, P., and Koupparis, M.,** 2000. Evaluation and validation of two fluorometric HPLC methods for the determination of aflatoxin B₁ in olive oil, *Food Additives and Contaminants*, **17**, 65-73.
- Darı, S.,** 2005. Zeytin Yetiştiriciliği, *T.C. Samsun Valiliği İl Tarım Müdürlüğü*, Samsun.
- Diraman, H., ve Arıcı, M.,** 2002. Zeytinin Mikroflorası, Sofralık Zeytin ve Ürünlerinde Mikotoksin Problemi, *TSE Standard*, **4**, 29-34.
- EFSA,** 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed, *The European Food Safety, Authority Journal*, **101**, 1-36.
- El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M., and Pfohl-Leszkowicz, A.,** 2006. Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B₁) in black table olives ‘Greek style’ of Moroccan origin, *Molecular Nutrition & Food Research*, **50**, 507-512.
- Elias, B. C., Said, S., Albuquerque, S., and Pupo, M. T.,** 2006. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck, *Microbiological Research*, **161**, 273-280.
- Elmholt, S., Labouriau, R., Hestbjerg, H., and Nielsen, J.,M.,** 1999. Detection and estimation of conidial abundance of *Penicillium verrucosum* in soil by dilution plating on a selective and diagnostic agar medium (DYSG), *Mycological Research*, **103**, 887-895.
- Elmholt, S., and Rasmussen, P. H.,** 2005. *Penicillium verrucosum* occurrence and Ochratoxin A contents in organically cultivated grain with special reference to ancient wheat types and drying practice, *Mycopathologia*, **159**, 421-432.
- Eltem, R.,** 1996. Growth and aflatoxin B₁ production on olives and olive paste by moulds isolated from ‘Turkish-style’ naturel black olives in brine, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **32**, no. 1-2, pp. 217-223.
- Eltem, R., and Öner, M.,** 1995. Salamura Tipi Sofralık Siyah Zeytinlerin Küf Florasının İncelenmesi, *Turkish Journal of Biology*, **19**, 11-17.
- Esteban, A., Abarca, M. L., Bragulat, M. R., and Cabañes, F. J.,** 2006. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*, *Food Microbiology*, **23**, 634-640.
- Fernandez, G. A., Diez, M. J. F., and Adams, M. R.,** 1997. *Table Olives: Production and Processing*, Chapman & Hall, London.
- Fernández Gonzalez, M. J., García, P. G., Fernández, A. G., and Quintana, M. C. D.,** 1993. Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar, *Journal of Applied Bacteriology*, **75**, 226-233.

- Finoli, C., Vecchio, A., and Planeta, D.,** 2005. Mycotoxin occurrence in extra virgin olive oils and in olives, *Industrie Alimentari*, Vol. **44**, no. 447, pp. 506-514.
- Frisvad, J. C., Lund, F., and Elmholt, S.,** 2005. Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability, *Journal of Applied Microbiology*, **98**, 684-692.
- Gallo, A., Perrone, G., Solfrizzo, M., Epifani, F., Abbas, A., Dobson, A. D. W., and Mulè, G.,** 2009. Characterisation of a *pks* gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*, *International Journal of Food Microbiology*, **129**, 8-15.
- Gambutì, A., Strollo, D., Genovese, A., Ugliano, M., Ritieni, A., and Moio, L.,** 2005. Influence of Enological Practices on Ochratoxin A Concentration in Wine, *American Journal of Enology and Viticult*, Vol. **56**, no. 2, pp. 155-162.
- Garcia, E., Luh, B. S., and Martin, M. H.,** 2005. Olives. In M. Diane, M. Barrett Diane, P. Barrett Laszlo, P. Somogyi Laszlo, S. Somogyi Hosahalli, & S. Ramaswamy Hosahalli (Eds.), *Processing Fruits Science and Technology* (2nd Ed., Chapter 31). CRC Press, LLC.
- Gareis, M., and Gareis, E. M.,** 2007. Guttation droplets of *Penicillium nordicum* and *Penicillium verrucosum* contain high concentrations of the mycotoxins ochratoxin A and B, *Mycopathologia*, **163**, 207-214.
- Ghitakou, S., Koutras, K., Kanellou, E., and Markaki, P.,** 2006. Study of aflatoxin B₁ and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in black and green olives of Greek origin, *Food Microbiology*, Vol. **23**, no. 7, pp. 612-621.
- Gourama, H., and Bullerman, L. B.,** 1988. Mycotoxin production by moulds isolated from Greek style black olives, *International Journal of Food Microbiology*, **1**, 81-90.
- Guyonnet, D., Belloir, C., Suschetet, M., Siess, M. H., and Le Bon, A. M.,** 2002. Mechanism of Protection Against Aflatoxin B(1) Genotoxicity in Rats Treated by Organosulfur Compounds from Garlic, *Carcinogenesis*, Vol. **23**, no. 8, pp. 1335-1341.
- Heperkan, D., Erol-Meriç, B., Şişmanoğlu, G., Dalkiliç, G., and Güler, F. K.,** 2006. Mycobiota, mycotoxigenic fungi and citrinin production in black olives, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **571**, 203-210.
- IARC,** 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, *International Agency for Research on Cancer*, **56**, 489-521.
- Jelinek, C. F., Pohland, A. E., and Wood, G. E.,** 1989. Review of Mycotoxin Contamination, Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds-An Update, *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Vol. **72**, no. 2, pp. 223-230.

- Jolly, P., Jiang, Y., Ellis, W., Awuah, R., Nnedu, O., Phillips, T., Wang, J. S., Gyawu, E. A., Tang, L., Person, S., Williams, J., and Jolly, C.,** 2006. Determinants of aflatoxin levels in Ghanaians: Sociodemographic factors, knowledge of aflatoxin and food handling and consumption practices, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Vol. **209**, no. 4, pp. 345-358.
- Joosten, H. M. L. J., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M., and Bucheli, P.,** 2001. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries, *International Journal of Food Microbiology*, **65**, 39-44.
- Kapetanakou, A. E., Panagou, E. Z., Gialitaki, M., Drosinos, E. H., and Skandamis, P. N.,** 2009. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins, *Food Control*, **20**, 725-732.
- Karadeniz, F., ve Ekşi, A.,** 2002. Gıdalarda Mikotoksin Oluşumu ve Azaltılması, *Dünya Gıda*, **7**, 104-110.
- Karagözlü, N., ve Karapınar, M.,** 2000. Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Ochratoxin-A ve Fungal Kontaminasyon, *Turkish Journal of Biology*, **24**, 561-572.
- Klich, M. A., Tang, S., and Denning, D. W.,** 2009. Aflatoxin and Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species Under Ex Vivo Conditions, *Mycopathologia*, **168**, 185-191.
- Koidis, A., Triantafyllou, E., and Boskou, D.,** 2008. Endogenous microflora in turbid virgin olive oils and the physicochemical characteristics of these oils, *European Journal of Lipid Science and Technology*, Vol. **110**, no. 2, pp. 164-171.
- Leong, S. L., Hocking, A. D., and Scott, E. S.,** 2006. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium, *International Journal of Food Microbiology*, **110**, 209-216.
- Leoni, L. A. B., Furlani, R. P. Z., Soares, L. M. V., and Oliveira, P. L. C.,** 2001. Ochratoxin A in Brazilian Green Coffee, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Vol. **21**, no. 1, pp. 105-107.
- Leontopoulos, D., Siafaka, A., and Markaki, P.,** 2003. Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B₁ production, *Food Microbiology*, **20**, 119-126.
- Li, K. Y.,** 2004. Fermentation: Principles and Microorganisms. In Y.H. Hui, S. Ghazala, D.M. Graham, K.D. Murrell & W.K. Nip (Eds.), *Handbook of Vegetable Preservation and Processing* (Chapter 9). Marcel Dekker, Inc.
- Lin, L. C., Chen, P. C., Fu, Y. M., and Shih, D. Y. C.,** 2005. Ochratoxin A Contamination in Coffees, Cereals, Red Wines and Beers in Taiwan, *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. **13**, no. 1, pp. 84-92.

- Lindblad, M., Johnsson, P., Jonsson, N., Lindqvist, R., and Olsen, M.,** 2004. Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts, *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 609-616.
- Lino, C. M., Baeta, L., Silveira, A. S. P. I. N.,** 2006. Determination of Ochratoxin A in Coriander (*Coriandrum sativum* L.) by HPLC/Fluorescence Detection, *Quimica Nova*, Vol. **29**, no. 3, pp. 436-439.
- Lombaert, G. A., Pellaers, P., Neumann, G., Kitchen, D., Huzel, V., Trelka, R., Kotello, S., and Scott, P. M.,** 2004. Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market, *Food Additives and Contaminants*, Vol. **21**, no. 6, pp. 578-585.
- Luh, B. S., and Woodroof, J. G.,** 1988. *Commercial Vegetable Processing* (2nd ed., pp. 480-491). AVI book, van Nostrand Reinhold, New York.
- Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., and Gould, G. W.,** 2000. *The Microbiological Safety and Quality of Food 1* (pp. 696-701). Gaithersburg, Aspen Publishers.
- Lund, F., and Frisvad, J. C.,** 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A, *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 1117-1123.
- Marín, S., Bellí, N., Lasram, S., Chebil, S., Ramos, A. J., Ghorbel, A., and Sanchis, V.,** 2006. Kinetics of ochratoxin a production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels, *Journal of Food Science*, Vol. **71**, no. 6, pp. 196-200.
- Marin, S., Hodzic, I., Ramos, A. J., and Sanchis, V.,** 2008. Predicting the growth/no-growth boundary and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in pistachio nuts, *Food Microbiology*, **25**, 683-689.
- Marsilio, V., Lanza, B., and De Angelis, M.,** 1996. Olive Cell Wall Components: Physical and Biochemical Changes during Processing, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **70**, 35-43.
- Martins, M. L., Martins, H. M., and Bernardo, F.,** 2003. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food, *Revista Portuguesa de Ciências veterinárias*, Vol. **98**, no. 548, pp. 179-183.
- Mateo, F., Gadea, R., Medina, Á., Mateo, R., and 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**, 915-927.
- Medina, Á., Mateo, R., Valle-Algarra, F. M., Mateo, E. M., and Jiménez, M.,** 2007. Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes, *International Journal of Food Microbiology*, **119**, 230-235.

- Meriç, B., ve Heperkan, D.,** 2001. Penicillium cinsi bazı küflerin mikotoksin oluşturma özelliklerinin zeytinde incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Miraglia, M., and Brera, C.,** 2002. Task 3.2.7 "Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States". Directorate General Health and Consumer Protection, p. 152.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., and Magan, N.,** 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel, *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 439-445.
- Monaci, L., Palmisano, F., Matrella, R., and Tantillo, G.,** 2005. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, Vol. **1090**, no. 1-2, pp. 184-187.
- Moura, M. A., Machado, C. H., Porfírio, L. C., and Freire, R. B.,** 2004. Effects of Ochratoxin a on Broiler Leukocytes, *Brazilian Journal of Poultry Science*, Vol. **6**, no. 3, pp. 187-190.
- Murphy, P., Hendrich, S., Landgren, C., and Bryant, C. M.,** 2006. Food Mycotoxins: An Update, *Journal of Food Science*, Vol. **71**, no. 5, pp. 51-65.
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M., and Ueno, Y.,** 1997. Survey of Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A in Commercial Green Coffee Beans by High-performance Liquid Chromatography Linked with Immunoaffinity Chromatography, *Food and Agricultural Immunology*, **9**, 77-83.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., and Samson, R. A.,** 2008. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand, *International Journal of Food Microbiology*, **128**, 197-202.
- Nychas, G.,** 1995. Natural antimicrobials from plants. In G. Gould (Ed.), *New methods of food preservation* (pp.58-59). Glasgow, Blackie Academic & Professional.
- Oral, J. ve Heperkan, D.,** 1999. *Lactobacillus Plantarum*'un Penicillium Mikotoksinlerine Etkisinin Zeytinde İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Özay, G., Borcaklı, M., Alperden, İ., Özsan, E., and Erdek, Y.,** 1994. Farklı İki Tip Zeytin (Gemlik ve Edincik) Fermantasyonlarının Kimyasal ve Mikrobiyolojik Yöneden İncelenmesi, *Gıda*, Vol. **19**, no. 1, pp. 37-43.
- Özkaya, Ş., ve Temiz, A.** (2003). Aflatoksinler: Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri ve Detoksifikasyonları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, Vol. **01**, no. 01, pp. 1-21. Alındığı tarih 12.01.2009, <<http://www.microbiology.org>>

- Öztürk, F.**, 2006. 'Türkiye Zeytincilik Sektörünün Genel Durumu' Zeytin Yetiştiriciliği, *Zeytincilik Araştırma Enstitüsü* (Yayın No. 61). Bornova, İzmir.
- Panagou, E. Z.**, 2006. Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20°C, *Food Science and Technology*, Vol. **39**, no. 4, pp. 322-329.
- Papachristou, A., and Markaki, P.**, 2004. Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography, *Food Additives and Contaminants*, **21**, 85–92.
- Pardo, E., Malet, M., Marín, S., Sanchis, V., and Ramos, A. J.**, 2006b. Effects of water activity and temperature on germination and growth profiles of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* isolates on barley meal extract agar, *International Journal of Food Microbiology*, **106**, 25-31.
- Pardo, E., Marin, S., Ramos, A. J., and Sanchis, V.**, 2006a. Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention-a review, *Food Additives and Contaminants*, Vol. **23**, no. 4, pp. 398-410.
- Pateraki, M., Dekanea, A., Mitchell, D., Lydakis, D., and Magan, N.**, 2007. Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on in vitro germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes, *Postharvest Biology and Technology*, **44**, 141-149.
- Patiño, B., González-Salgado, A., González-Jaén, M. T., and Vázquez, C.**, 2005. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species, *International Journal of Food Microbiology*, **104**, 207-214.
- Petersson, S., Hansen, M. W., Axberg, K., Hult, K., and Schnürer, J.**, 1998. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* ve *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycological Research*, **102**, 1003-1008.
- Pfohl-Leszkowicz, A., and Manderville, R.A.**, 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans, *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, 61-99.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., and Castegnaro, M.**, 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins, *Food Additives and Contaminants*, Vol. **19**, no. 3, pp. 282-302.
- Pitt, J. I.**, 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and Production of Ochratoxin A, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **53**, no. 2, pp:266-269.

- Pitt, J. I., and Hocking, A. D.,** 1997. *Penicillium* and related genera. In *Fungi and Spoilage* (2nd ed., pp. 251-255). Blackie Academic & Professional, London.
- Pohland, A. E., Nesheim, S., and Friedman, L.,** 1992. Ochratoxin A: A Review, *Pure and Applied Chemistry*, Vol. **64**, no. 7, pp. 1029-1046.
- Pollastro, S., De Miccolis Angelini, R. M., and Faretra, F.,** 2006. A New Semi-Selective Medium For The Ochratoxigenic Fungus *Aspergillus carbonarius*, *Journal of Plant Pathology*, Vol. **88**, no. 1, pp. 107-112.
- Prajapati, J. B., and Nair, B. M.,** 2003. The History of Fermented Foods. In E.R. Farnworth (Ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods* (pp. 1-25). CRC Press, LLC.
- Puntarić, D., Bošnjir, J., Šmit, Z., Škes, I., and Baklaić, Z.,** 2001. Ochratoxin A in Corn and Wheat: Geographical Association with Endemic Nephropathy, *Croatian Medical Journal*, Vol. **42**, no. 2, pp. 175-180.
- Qin, G., Gopalan-Kriczky, P., Su, J., Ning, Y., and Lotlikar, P. D.,** 1997. Inhibition of Aflatoxin B₁-Induced Initiation of Hepatocarcinogenesis in the Rat by Green Tea, *Cancer Letters*, Vol. **112**, no. 2, pp. 149-154.
- Rastogi, S., Dogra, R. K. S., Khanna, S. K., and Das, M.,** 2005. Skin tumorigenic potential of aflatoxin B₁ in mice, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. **44**, no. 5, pp. 670-677.
- Robinson, R. K.,** 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*. UK, Academic Press.
- Romero, S. M., Alberto, M. R., Manca de Nadra, M. C., and Vaamonde, G.,** 2009. Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* by flavonoid and nonflavonoid compounds, *Mycotoxin Research*, **25**, 165-170.
- Romero, S. M., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., and Vaamonde, G.,** 2007. Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits, *International Journal of Food Microbiology*, **115**, 140-143.
- Roussos, S., Nabila, Z., Salih, G., Tantaoui-Elaraki, A., Lamrani, K., Cheheb, M., Hassouni, H., Verhé, F., Perraud-Gaime, I., Augur, C., and Ismaili-Alaoui, M.,** 2006. Characterization of filamentous fungi isolated from Moroccan olive and olive cake: Toxinogenic potential of *Apergillus* strains, *Molecular Nutrition & Food Research*, **50**, 500-506.
- Ruangwises, S., and Ruangwises, N.,** 2009. Occurrence of aflatoxin M₁ in pasteurized milk of the School Milk Project in Thailand, *Journal of Food Protection*, Vol. **72**, no. 8, pp. 1761-1763.
- Rubia-Soria, A., Abriouel, H., Lucas, R., Omar, N. B., Martínez-Cañamero, M., and Gálvez, A.,** 2006. Production of antimicrobial substances by bacteria isolated from fermented table olives, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **22**, 765-768.

- Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Warner, P. J., and Jiménez-Díaz, R.,** 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a Bacteriocin Producer, as a Starter Culture in Spanish-Style Green Olive Fermentations, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **60**, no. 6, pp. 2059-2064.
- Salem, M. H., Kamel, K. I., Yousef, M. I., Hassan, G. A., and El-Nouty, F. D.,** 2001. Protective Role of Ascorbic Acid Enhance Semen Quality of Rabbits Treated with Sublethal Doses of Aflatoxin B(1), *Toxicology*, Vol. **162**, no. 3, pp. 209-218.
- Samapundo, S, De Meulenaer, B., Osei-Nimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, J., and Devlieghere, F.,** 2007. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage?, *Food Microbiology*, **24**, 465–473.
- Sánchez-Ortiz, A., Romero, C., Pérez, A. G., and Sanz, C.,** 2008. Oxygen Concentration Affects Volatile Compound Biosynthesis during Virgin Olive Oil Production, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 4681-4685.
- Saygın Gümüskesen, A., ve Yemişçioğlu, F.,** 2007. Türkiye'deki Zeytin Çeşitlerinin ve Zeytinyağlarının Bölgesel Karakterizasyonu, *Proje Sonuç Raporu*, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Schatzmayr, G., Zehner, F., Taubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A. P., and Binder, E. M.,** 2006. Microbiologicals for Deactivating Mycotoxins, *Molecular Nutrition & Food Research*, Vol. **50**, no. 6, pp. 543-551.
- Schmidt-Heydt, M., Richter, W., Michulec, M., Buttinger, G., and Geisen, R.,** 2008. Comprehensive molecular system to study the presence, growth and ochratoxin A biosynthesis of *Penicillium verrucosum* in wheat, *Food Additives and Contaminants*, Vol. **25**, no. 8, pp. 989-996.
- Scott, P. M., and Lawrence, G.A.,** 1997. Determination of Aflatoxins in beer, *Journal of AOAC International*, Vol. **80**, no. 6, pp. 1229-1234.
- Selouane, A., Bouya, D., Lebrihi, A., Decock, C., and Bouseta, A.,** 2009. Impact of Some Environmental Factors on Growth and Production of Ochratoxin A of/by *Aspergillus tubingensis*, *A. niger*, and *A. carbonarius* Isolated from Moroccan Grapes, *The Journal of Microbiology*, Vol. **47**, no. 4, pp. 411-419.
- Serra, R., Mendonça, C., Abrunhosa, L., Pietri, A, and Venâncio, A.,** 2004. Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation, *Analytica Chimica Acta*, **513**, 41-47.
- Skaug, M. A.,** 2003. Levels of Ochratoxin A and IgG Against Canidia of *Penicillium verrucosum* in Blood Samples From Healthy Farm Workers, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **10**, 73-77.
- Soyoz, M., Özçelik, N., Kiliç, I., and Altuntaş, I.,** 2004. The Effects of Ochratoxin A on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes: A Protective Role of Melatonin, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. **20**, no. 4, pp. 213-219.

- Şahin, İ., Başoğlu, F., Korukoğlu, M., and Göçmen, D.,** 1999. Salamura Siyah Zeytinlerde Rastlanan Küfler ve Mikotoksin Riskleri, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, Vol. **22**, no. 2, pp. 1-8.
- Tang, L., Guan, H., Ding, X., and Wang, J. S.,** 2007. Modulation of Aflatoxin Toxicity and Biomarkers By Lycopene in F344 Rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. **219**, no. 1, pp. 10-17.
- Tassou, C. C., Natskoulis, P. I., Panagou, E. Z., Spiropoulos, A. E., and Magan, N.,** 2007. Impact of Water Activity and Temperature on Growth and Ochratoxin A Production of Two *Aspergillus carbonarius* Isolates from Wine Grapes in Greece, *Journal of Food Protection*, Vol. **70**, no. 12, pp. 2884-2888.
- Taydaş, E. E., ve Aşkın, O.,** 1995. Kırmızı Biberlerde Aflatoksin Oluşumu, *Gıda*, Vol. **20**, no. 1, pp. 3-8.
- Tetik, H. D.,** 2001. Sofralık Zeytin İşleme Teknikleri, *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Zeytincilik Araştırma Enstitüsü* (Yayın No. 53). Bornova, İzmir.
- TGK,** 2009. Türk Gıda Kodeksi, Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (22), *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü*, Ankara.
- Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Kazantzidou, A., Antonopoulos, D. F., Papageorgiou, I., and Tjamos, E. C.,** 2004. *Aspergillus niger* ve *Aspergillus carbonarius* in Corinth Raisin and Wine-Producing Vineyards in Greece: Population Composition, Ochratoxin A Production and Chemical Control, *Journal of Phytopathology*, **152**, 250-255.
- Torres-Villa, L. M., Rodriguez-Molina, M. C., and Martinez, J. A.,** 2003. Olive fly damage and olive storage effects on paste microflora and virgin olive oil acidity, *Grasas y Aceities*, Vol. **54**, no.3, pp. 285-294.
- Toussaint, G., Lafaverge, F., and Walker, E. A.,** 1997. The use of high pressure liquid chromatography for determination of aflatoxin in olive oil, *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, **3-4**, 325-334.
- TS-774,** 2003. Sofralık Zeytin Standardı, *Türk Standartları Enstitüsü*, Ankara.
- TS-2131 ISO 928,** 2001. Baharat ve Çeşni Veren Bitkiler-Toplam Kül Tayini, *Türk Standartları Enstitüsü*, Ankara.
- Url-1** <<http://www.internationaloliveoil.org>>, alındığı tarih 25.11.2009.
- Url-2** <<http://www.fao.org>>, alındığı tarih 07.12.2009.
- Url-3** <<http://www.theoliveleaf.com>>, alındığı tarih 25.11.2009.
- Url-4** <<http://www.typesofolives.com>>, alındığı tarih 22.08.2009.
- Url-5** <<http://www.food-info.net>>, alındığı tarih 14.12.2009.
- Url-6** <<http://www.food.gov.uk>>, alındığı tarih 18.10.2009.
- Url-7** <<http://darwin.bio.ucm.es>>, alındığı tarih 26.11.2009.
- Url-8** <<http://www.dehs.umn.edu>>, alındığı tarih 10.06.2009.

Url-9 <<http://www.fehd.gov.hk>>, alındığı tarih 16.09.2006.

Uylaşer, V., ve Karaman, B., 2005. Zeytin, zeytinyağı ve beslenmedeki önemi, *Gıda*, **2**, 68-70.

Uylaşer, V., and Şahin, İ., 2004. Salamura Siyah Zeytin Üretiminde Geleneksel Gemlik Yönteminin Günümüz Koşullarına Uyarlanması, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, Vol. **18**, no. 1, pp. 105-113.

Valero, A., Farré, J. R., Sanchis, V., Ramos, A. J., and Marín, S., 2006. Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures, *Food Microbiology*, **23**, 753-756.

Van Der Stegen, G. H. D., Essens, P. J. M., and Van Der Lijn, J., 2001. Effect of Roasting Conditions on Reduction of Ochratoxin A in Coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4713-4715.

Verma, R. J., and Nair, A., 2001. Vitamin E Ameliorates Aflatoxin-Induced Biochemical Changes in the Testis of Mice, *Asian Journal of Andrology*, Vol. **3**, no. 4, pp. 305-309.

Visconti, A., Pascale, M., and Centonze, G., 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **864**, 89-101.

Vries, J. D., 1997. *Food Safety and Toxicity* (pp. 25-29). Boca Raton, CRC Press.

Weidenbörner, M., 2001. *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. New York, Springer.

Wijnands, L. M., and Leusden, F. M., 2000. An overview of adverse health effects caused by mycotoxins and bioassays for their detection, *Ruksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu, RIVM Report-257852004*.

Wood, B. J. B., 1998. *Microbiology of Fermented Foods* (2nd ed., pp. 59-67). UK, Blackie Academic & Professional.

Yassa, I. A., Abdalla, E. A. M., and Aziz, S. Y., 1994. Aflatoxin B₁ production by molds isolated from black table olives, *Annals of Agricultural Science*, **39**, 525-537.

Yoltaş, A., ve Haliki-Uztan, A. (2008). Hava Kaynaklı Küflerin Toksinleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, Vol. **06**, no. 3, pp. 39-52. Alındığı tarih 12.01.2009, <<http://www.microbiology.org>>

Yorulmaz, A., Erinç, H., ve Tekin, A., 2009. Çekirdeksiz Üretimin Zeytinyağı Kalitesine Etkisi, *Gıda Teknolojisi*, Vol. **13**, no. 2, pp. 68-72.

Yu, M. W., Zhang, Y. J., Blaner, W. S., and Santella, R. M., 1994. Influence of Vitamins A, C and E and Beta-Carotene on Aflatoxin B₁ Binding to DNA in Woodchuck Hepatocytes, *Cancer*, Vol. **73**, no. 3, 596-604.

EKLER

EK A.1 : İstatistiksel hesap tabloları

EK A.2 : OTA standart kromatogramları

EK A.3 : Aflatoksin mix ($AFB_1+AFB_2+AFG_1+AFG_2$) standart kromatogramları

EK A.1

Çizelge A.1 : Farklı sıcaklık dereceleri için varyans analizi (*P. verrucosum*).

V.K.	S.D.	S.S.	M.S.	F ₀	F _{cetvel}
Sıcaklık	4	75,41	18,85	9,69	2,87
Süre	5	24,26	4,85		
Hata	20	38,93	1,95		
Toplam	29	138,60			

α : 0,05

Çizelge A.2 : Duncan'ın çoklu aralık testi (*P. verrucosum*).

Sıcaklık	Ortalamalar
10°C	2,81 _b
15°C	5,31 _a
20°C	6,70 _a
30°C	6,81 _a
25°C	7,05 _a

Çizelge A.3 : Farklı sıcaklık dereceleri için varyans analizi (*A. carbonarius*).

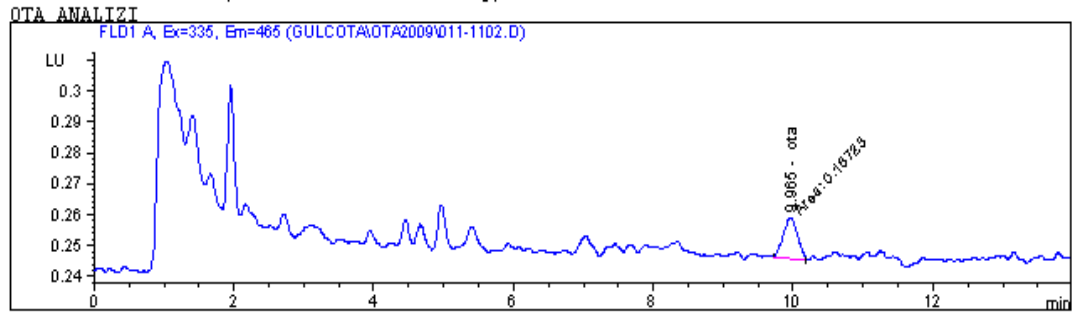
V.K.	S.D.	S.S.	M.S.	F ₀	F _{cetvel}
Sıcaklık	4	2858,97	714,74	7,10	2,87
Süre	5	3250,47	650,09		
Hata	20	2012,54	100,63		
Toplam	29	8121,98			

α : 0,05

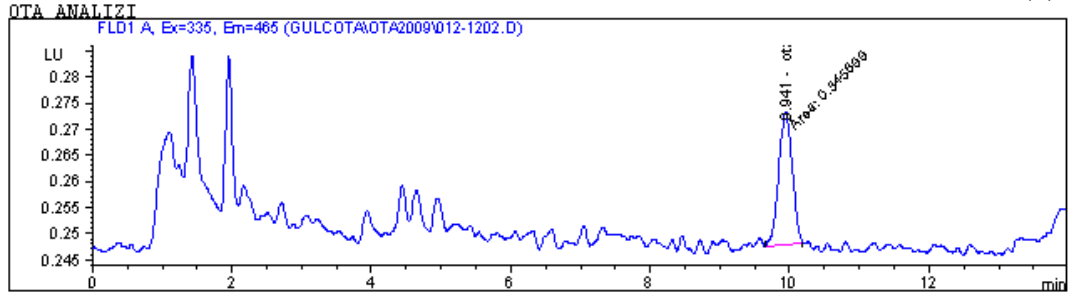
Çizelge A.4 : Duncan'ın çoklu aralık testi (*A. carbonarius*).

Sıcaklık	Ortalamalar
20°C	22,16 _b
30°C	22,41 _b
25°C	24,05 _b
35°C	29,02 _b
15°C	48,03 _a

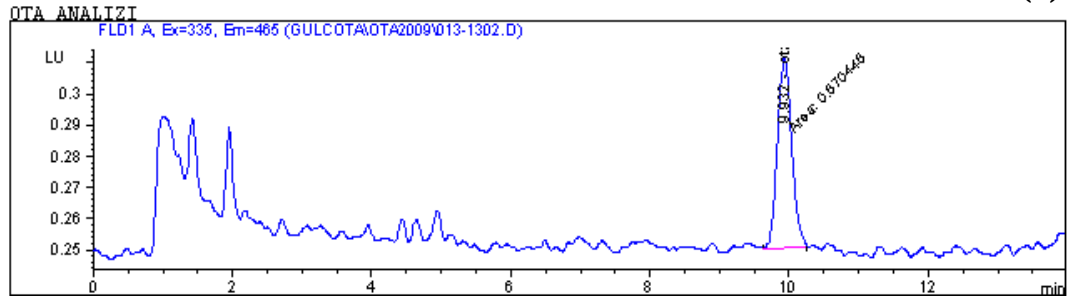
EK A.2



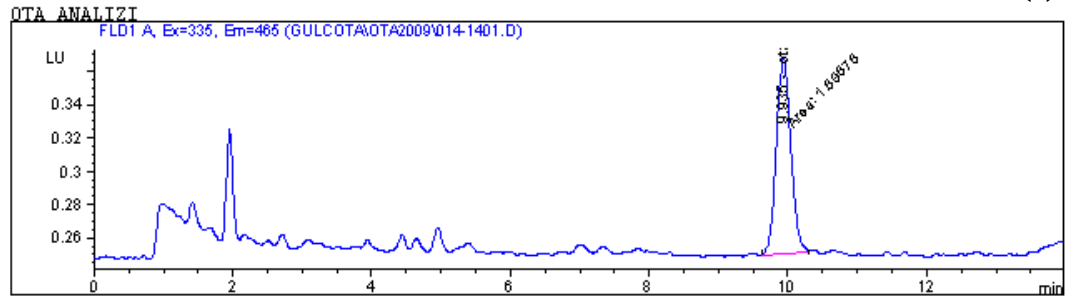
(a)



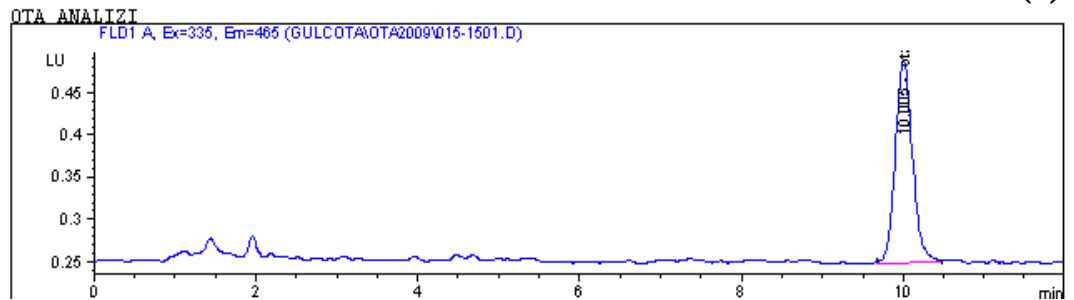
(b)



(c)



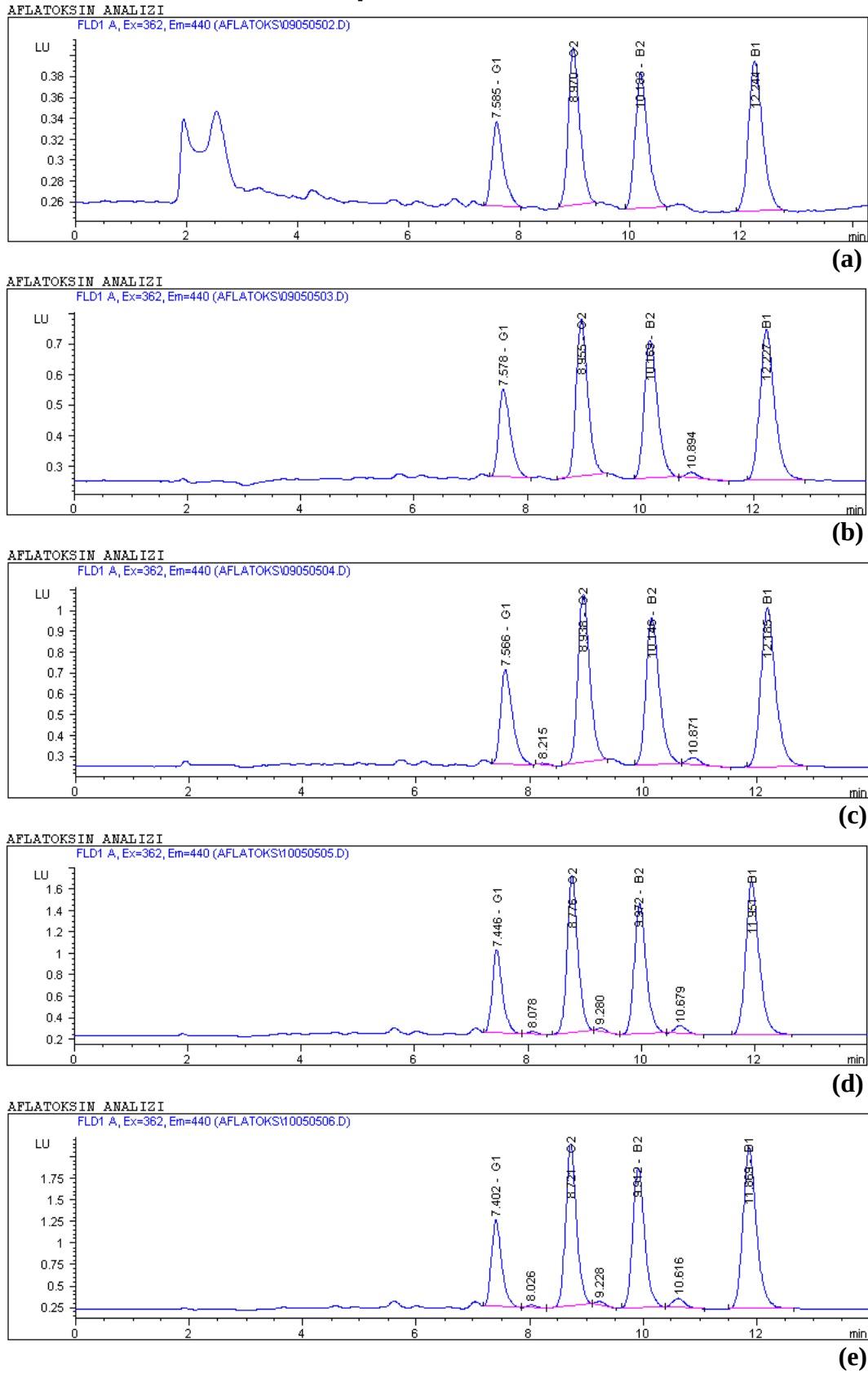
(d)



(e)

Şekil A.1: OTA standart kromatogramları: (a) 1 ppb OTA. (b) 2 ppb OTA. (c) 5 ppb OTA. (d) 10 ppb OTA. (e) 20 ppb OTA.

EK A.3



Şekil A.2: Aflatoksin mix (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) standart kromatogramları:
(a) 0,4 ppb AFB₁. (b) 1,2 ppb AFB₁. (c) 2 ppb AFB₁. (d) 2,8 ppb AFB₁.
(e) 3,6 ppb AFB₁.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Gülçin DAZKIR (ŞİŞMANOĞLU)

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 1979

Lisans: Trakya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (1996-2000)

Yüksek Lisans: İstanbul Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
(2000-2003)

Yayın Listesi:

- Heperkan, D., **Dazkır, G. S.**, Guler, F. K., and Ertugrul, S., 2010. Occurrence of Mycotoxins in Black Olives and Their Health Effects, *III. International Table Olive Conference*, Seville, Spain, March 9-10.
- Heperkan, D., **Dazkır, G. S.**, Kansu, D. Z., and Karbancıoğlu Güler, F., 2009. Influence of temperature on citrinin accumulation by *Penicillium citrinum* and *Penicillium verrucosum* in black table olives, *Toxin Reviews*, Vol. **28**, no.2-3, pp. 180-186.
- Heperkan D., Erol-Meriç B., **Şişmanoğlu G.**, Dalkılıç G., and Güler F. K., 2006. Mycobiota, mycotoxigenic fungi and citrinin production in black olives, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **571**, 203-210.
- **Şişmanoğlu, G.**, ve Heperkan, D., 2005. Zeytinde sitrinin oluşumu ve önemi, *II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*, İTÜ, İstanbul, Mayıs 23-24.
- Heperkan, D., **Şişmanoğlu, G.**, Dalkılıç, G., and Karbancıoğlu-Güler, F., 2004. Mycotoxins in black olives, *5th International Symposium on Olive Growing*, İzmir, September 27-October 2.
- **Şişmanoğlu, G.**, and Heperkan, D., 2004. Effect of time, temperature and salt concentration on citrinin production in black olives, *XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, USA, May 17-21.
- Heperkan, D., Erol-Meriç, B., **Şişmanoğlu, G.**, and Dalkılıç, G., 2003. Mycobiota, mycotoxigenic fungi and citrinin production in black olives. In J. I. Pitt, A. D. Hocking, and U. Thrane (Eds.), *Proceedings of the International Commission on Food Mycology* (p. 26). Kluwer Academic/Plenum Publ. N.Y, USA, 26.
- **Şişmanoğlu, G.**, ve Heperkan, D., 2003. Gıdalarda sitrinin oluşumu, *I. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*, İTÜ, İstanbul, Eylül 18-19.