

***PENİCİLLIUM VERRUCOSUM'UN SİYAH VE YEŞİL
ZEYTİNLERDE OKRATOKSİN A VE SİTRİNİN
ÜRETME YETENEĞİNİN İNCELENMESİ***

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda Müh. Duygu ZORLUTUNA**

Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

HAZİRAN 2006

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PENICILLIUM VERRUCOSUM'UN SİYAH VE YEŞİL
ZEYTİNLERDE OKRATOKSİN A VE SİTRİNİN ÜRETME
YETENEĞİNİN İNCELENMESİ***

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda Müh. Duygu ZORLUTUNA
506021416**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 8 Mayıs 2006
Tezin Savunulduğu Tarih : 12 Haziran 2006**

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Dilek HEPERKAN
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Kamil BOSTAN (İ.Ü.)
Prof.Dr. Dilek BOYACIOĞLU (İ.T.Ü.)**

HAZİRAN 2006

ÖNSÖZ

Çalışmamın tüm aşamalarında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, fikirleriyle beni yönlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Dilek HEPERKAN'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmam süresince gösterdiği ilgi ve yardımları nedeni ile Araştırma Görevlisi arkadaşım Funda K. GÜLER'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında sağladığı katkılar için ALBİO A.Ş.'ye saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Değerli eşim Can KANSU'ya zorlu tez dönemimde bana gösterdiği destek ve anlayış için sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamı, tüm hayatım boyunca bana destek olan ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem Özel ve babam Bahaettin ZORLUTUNA'ya ithaf ediyorum.

Haziran 2006

Duygu ZORLUTUNA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	ix
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Zeytin Üretimi	3
2.1.1 Dünyada ve Türkiye’de Sofralık Zeytin Üretimi	4
2.1.2 Dünyada ve Türkiye’de Sofralık Zeytin İhracatı	6
2.1.3 Dünyada ve Türkiye’de Sofralık Zeytin İthalatı	8
2.1.4 Sofralık Zeytin Üretim Yöntemleri	8
2.1.4.1 İspanyol Tipi Yeşil Zeytin Üretimi	9
2.1.4.2 Kaliforniya Tipi Siyah Zeytin Üretimi	10
2.1.4.3 Yunan Tipi Siyah Zeytin Üretimi	10
2.1.5 Fermantasyon Sırasında Zeytinlerde Görülen Mikrobiyolojik ve Kimyasal Değişiklikler	11
2.1.5.1 Yeşil Zeytin Fermantasyonu	11
2.1.5.2 Konserve Zeytin Fermantasyonu	12
2.1.5.3 Naturel Siyah Zeytin Fermantasyonu	13
2.2 Zeytinlerde Görülen Bozulmalar	14
2.2.1 Siyah Zeytinlerde Görülen Bozulmalar	15
2.2.1.1 Zar Oluşumu	15
2.2.1.2 Yumuşama	15
2.2.1.3 Sünme	16
2.2.2 Yeşil Zeytinlerde Görülen Bozulmalar	16
2.2.2.1 Zar Oluşumu	16
2.2.2.2 Kararma	16
2.2.2.3 Gaz Cebi Oluşumu	17
2.2.2.4 Bütirik Asit Kokması	17
2.2.2.5 Zapatera Hastalığı	17
2.2.2.6 Beyaz Noktalar	18
2.2.2.7 Yumuşama	18
2.3 Küf Gelişimi ve Mikotoksin Oluşumu	18
2.3.1 Mikotoksinlerin Oluşumunda Etkili Faktörler	18
2.3.2 Zeytinde Küf ve Mikotoksin Oluşumu	19
2.4 Mikotoksinlerle İlgili Yasal Düzenlemeler	20
2.5 <i>Penicillium verrucosum</i> ’un Özellikleri	21
2.6 Okratoksin A	22
2.6.1 Okratoksin A Üreten Küfler ve İzole Edildiği Gıdalar	23
2.6.2 Okratoksin A’nın Biyolojik Etkileri	24
2.7 Sitrinin	27
2.7.1 Sitrinin Üreten Küfler ve İzole Edildiği Gıdalar	28
2.7.2 Sitrinin’in Biyolojik Etkileri	29
2.8 Okratoksin A ve Sitrinin Kombinasyonunun Etkileri	31

3. MATERYAL VE METOT	33
3.1 Materyal	33
3.2 Metot	33
3.2.1 <i>Penicillium verrucosum</i> 'un Besiyerlerine Aşılması	34
3.2.2 Spor Süspansiyonunun Hazırlanması	36
3.2.3 Zeytinlerin Aşılması	37
3.2.4 Besiyerlerinde Mikotoksin Analizleri	37
3.2.5 Zeytinlerde Mikotoksin Analizleri	38
3.2.5.1 Zeytin Örneklerinde Okratoksin A Analizleri	38
3.2.5.2 Zeytin Örneklerinde Sitrinin Analizleri	39
3.2.5.3 Sitrinin Miktarının Hesaplanması	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	41
4.1 Besiyerlerinde Mikotoksin Analizleri	41
4.2 Zeytinlerde Yapılan Mikotoksin Analizleri	41
4.2.1 Zeytinlerde Yapılan Okratoksin A Analizleri	41
4.2.2 Zeytinlerde Yapılan Sitrinin Analizleri	48
5. SONUÇ	50
KAYNAKLAR	51
EKLER	57
ÖZGEÇMİŞ	91

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1 Dünyada ve Türkiye’de Zeytin Üretimine Ayrılan Alan (Ha).....	5
Tablo 2.2 Dünyada ve Türkiye’de Sofralık Zeytin İthalatı (00/01-03/04).....	8
Tablo 2.3 Okratoksin A’nın LD50 Değerleri.....	25
Tablo 2.4 Okratoksin A’nın Nefrotoksisite/Kanserojenite LOEL ve NOEL Değerleri.....	27
Tablo 2.5 Sitrininin LD ₅₀ Değerleri.....	29
Tablo 2.6: Okratoksin A ve Sitrinin Etkileşimleri.....	32
Tablo 4.1 14. Gün Sonunda Besiyerinde <i>P.verrucosum</i> Gelişimi ve Okratoksin A ve Sitrinin Oluşumu.....	41
Tablo 4.2 <i>Penicillium verrucosum</i> Aşılana Zeytinlerde Farklı Sıcaklık Derecelerinde Okratoksin A Oluşumu.....	43
Tablo 4.3 Okratoksin A’nın Farklı Konsantrasyonlarda Geri Kazanım Değerleri....	43
Tablo 4.4 <i>Penicillium verucosum</i> Aşılana Zeytinlerde Farklı Sıcaklık Derecelerinde Sitrinin Oluşumu.....	48
Tablo C.1 Siyah Zeytinde Farklı Sıcaklık Dereceleri İçin Varyans Analizi.....	91
Tablo C.2 Yeşil Zeytinde Farklı Sıcaklık Dereceleri İçin Varyans Analizi.....	91
Tablo C.3 20°C’de Siyah ve Yeşil Zeytin İçin Varyans Analizi.....	91
Tablo C.4 25°C’de Siyah ve Yeşil Zeytin İçin Varyans Analizi.....	91

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Zeytin Ağacı	4
Şekil 2.2: Zeytin Meyvesi	4
Şekil 2.3: Sofralık Zeytin Üretiminin Ükelere Göre Dağılımı (93/94-02/03)	6
Şekil 2.4: Sofralık Zeytin İhracatının Ükelere Göre Dağılımı (93/94-02/03)	7
Şekil 2.5: Okratoksin A'nın Kimyasal Yapısı	23
Şekil 2.6: Sitrinin Kimyasal Yapısı	28
Şekil 4.1 Okratoksin A Standardının HPLC Kromatogramı.....	42
Şekil 4.2 HPLC ile Okratoksin A Analizi için Kalibrasyon Grafiği.....	42
Şekil 4.3 Siyah Zeytinde 20°C'de Okratoksin A Oluşumu.....	44
Şekil 4.4 Siyah Zeytinde 25°C'de Okratoksin A Oluşumu.....	45
Şekil 4.5 Yeşil Zeytinde 20°C'de Okratoksin A Oluşumu.....	45
Şekil 4.6 Yeşil Zeytinde 25°C'de Okratoksin A Oluşumu.....	46
Şekil 4.7 Siyah Zeytinde Farklı Sıcaklıklarda Okratoksin A Oluşumu.....	46
Şekil 4.8 Yeşil Zeytinde Farklı Sıcaklıklarda Okratoksin A Oluşumu.....	47
Şekil 4.9 Siyah ve Yeşil Zeytinde 20°C'de Okratoksin A Oluşumu.....	47
Şekil 4.10 Siyah ve Yeşil Zeytinde 25°C'de Okratoksin A Oluşumu.....	48
Şekil 4.11 Yeşil Zeytinde 25°C'de Sitrinin Oluşumu.....	49

***PENICILLIUM VERRUCOSUM*'UN SİYAH VE YEŞİL ZEYTİNLERDE OKRATOKSİN A VE SİTRİNİN ÜRETME YETENEĞİNİN İNCELENMESİ**

ÖZET

Zeytin, ülke ekonomisi ve halkımızın beslenmesi yönünden önemi büyük tarımsal bir ürünüdür. Türkiye zeytin üretiminin %70'i yağlık, %30'u sofralık olarak değerlendirilmektedir. Sofralık zeytinler siyah ve yeşil olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ülkemizde üretilen sofralık zeytinlerin % 97'sini siyah zeytin oluşturmaktadır. İspanya, Türkiye, İtalya ve Yunanistan önemli zeytin üreticileridir.

Türkiye, dünya zeytin üreticisi ülkeler arasında ağaç varlığı yönünden 5. sırada, üretim bakımından ise 2. sıradadır. Bununla birlikte, Türkiye sofralık zeytin üretiminde 2. sırada yer almakta ve siyah zeytin üretiminde ise 1. sırada bulunmaktadır. Zeytin üretimimizin ancak %17'sini ihraç edebilmemiz sebebi ile, ülkemizin dünya ihracatındaki payı %10 kadardır. Bu durumun en önemli nedeni, zeytin işletmelerimizin çoğunun küçük ölçekte olması, üretimde tek düzelik ile pazarlamada belli bir düzenin sağlanamamasıdır. Bunun yanında, uzun yıllardır sofralık zeytin standardının uygulamada zorunlu olarak yer almaması, işlenen ürünün hem iç piyasa hem de dış piyasada uygunluk taşımamasını güçleştirmektedir. Böylece işlenmiş ürün daha çok iç piyasa tüketimine uygun olmakta, Türk damak zevkine göre uzun sürede işlenen tuzlu zeytinin ihracat şansı da düşük olmaktadır. Ayrıca teknolojik gelişmelerin takip edilmemesi, zeytinde acılığa neden olan oleuropeinin tam olarak uzaklaştırılmaması ve üretim hataları nedeni ile salamura yüzeyinde oluşan küf tabakası ve küflerin enzim aktiviteleri sonucu zeytinde olumsuz doku değişimlerine sebep olması diğer nedenlerdir.

Yüzeyde gelişen toksijenik küfler, mikotoksin adı verilen sekonder metabolitleri üretebilirler. Mikotoksinler, insan ve hayvan sağlığı üzerinde kanserojenik, teratojenik, mutajenik, nefrotoksik ve hepatotoksik etkilere neden olmaktadır. Zeytinlerde *Penicillium* türü küflerin dominant olduğu saptanmıştır.

Çalışmada materyal olarak çekirdeksiz, konserve, siyah ve yeşil zeytin kullanılmıştır. Siyah ve yeşil zeytinlerde *Penicillium verrucosum* tarafından okratoksin A(OTA) ve sitrinin (CIT) oluşumu üzerine sıcaklık ve süre etkisi incelenmiştir.

Bu çalışmada, *P. verrucosum* küfünün farklı besiyerlerinde, çeşitli sıcaklıklarda gelişme ve OTA ve CIT üretme özelliği incelenmiştir. Bu amaçla *P. verrucosum*, YES (Yeast Extract Agar), CYA (Czapek Yeast Extract Agar) ve MEA (Malt Extract Agar) besiyerlerine aşılmalı, 5°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C'de 14 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 14. günün sonunda besiyerlerinde ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemi ile OTA ve CIT analizleri yapılmıştır.

14. günün sonunda 5°C, 30°C ve 35°C'de inkübe edilen besiyerlerinde *P. verrucosum*'un gelişmediği görülmüştür. 15°C, 20°C ve 25°C'de inkübe edilen besiyerlerinde ise *P. verrucosum*'un geliştiği ve CIT ürettiği tespit edilirken, yalnız 25°C'de OTA'ya rastlanmıştır.

Çalışmanın bundan sonraki aşamasında, siyah ve yeşil zeytinler, *P. verrucosum* ile 10^6 spor/ml olacak şekilde aşılanmıştır. 20°C ve 25°C'de 30 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince belli aralıklarla OTA ve CIT analizleri yapılmıştır.

20°C ve 25°C'de inkübe edilen zeytinlerde 7., 14., 18., 21. ve 30. günlerde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapılan analizler sonucunda, siyah ve yeşil zeytinlerde OTA miktarının 21. günde en yüksek değerde olduğu bulunmuştur. 3., 7. ve 14. günlerde TLC ile yapılan CIT analizleri sonucunda, 20°C ve 25°C'de inkübe edilen siyah zeytinlerde ve 20°C'de inkübe edilen yeşil zeytinlerde CIT oluşmadığı belirlenmiştir. 25°C'de inkübe edilen yeşil zeytinlerde CIT oluştuğu ve zamana bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, siyah ve yeşil zeytinlerde OTA oluşumu açısından, 20°C ve 25°C inkübasyon sıcaklıkları arasındaki fark $P \leq 0.05$ olasılık düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Aynı sıcaklık derecesinde OTA oluşumu açısından, siyah ve yeşil zeytinler arasındaki farkın da $P \leq 0.05$ olasılık düzeyinde önemsiz olduğu görülmüştür.

Çalışmada kullanılan HPLC metodu ile OTA geri kazanım oranının belirlenmesi amacıyla 2 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$), 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb OTA standardı zeytin örneklerine eklenmiş ve OTA'nın geri kazanımı % 69.11 olarak bulunmuştur. TLC metodu ile CIT geri kazanım oranının belirlenmesi için zeytin örneklerine 200 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) CIT standardı zeytin örneklerine eklenmiş ve CIT'in geri kazanımı %76.3 olarak belirlenmiştir.

INVESTIGATION OF OCHRATOXIN A AND CITRININ PRODUCTION OF *PENICILLIUM VERRUCOSUM* ON BLACK AND GREEN OLIVES

SUMMARY

Olive is an important agricultural product for the nutritional benefits and national economy. 70% of olive production of Turkey is used for olive oil production and the remaining part is processed as black and green table olives. Table olive production of Turkey is mainly black table olives. The important olive producer countries are Spain, Turkey, Greece and Italy.

Turkey is fifth country in olive tree presence and second in olive production among olive producer countries in the world. Because of Turkey exports only 17% of its olive production, it has 10% of world olive exportation. The most important reasons of the low export amounts are the small scale olive processing establishments, non-standard olive production methods and failure to get a tactical marketing. Furthermore, without compulsory application of the national table olive standard in practise for many years cause to unsuitable products in both domestic an foreign markets. Thereby, long time processed salty olive products according to Turkish taste serve to domestic market and have a little chance to exportation. Also, other factors can be listed as lack in applying technological developments, the bitter taste caused by incomplete removal of the oleuropein, mould layer formation on the surface of saline sourced from production mistakes and unfavorable texture changes as a result of the enzymatic activities of moulds.

The toxigenic moulds grow on saline surface can produce seconder metabolites called as mycotoxin. Mycotoxins have carcinogenic, teratogenic, mutagenic, nephrotoxic and hepatotoxic effects on human and animal healths. It is determined that, the genus *Penicillium* dominate in olives.

In this study; stoneless, sterilized, black and green olives were used as the material. The effects of temperature and time parameters on OTA and CIT production of *Penicillium verrucosum* in black and green olives were investigated.

In this study, the production of OTA and CIT capability of *P. verrucosum* in different media and at several temperatures was investigated. For this purpose, *P. verrucosum* was inoculated on YES (Yeast Extract Agar), CYA (Czapek Yeast Extract Agar) and MEA (Malt Extract Agar) and incubated at 5°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C and 35°C for 14 days. At the end of 14. day, OTA and CIT were detected on inoculated media with thin layer chromatography (TLC).

It was seen that, *P. verrucosum* coludn't grow on the media incubated at 5°C, 30°C and 35°C at the end of 14. day. Although, *P. verrucosum* growing and CIT were determined on the media incubated at 15°C, 20°C and 25°C, OTA was determined only the media incubated on 25°C.

Black and green olives were inoculated with *P. verrucosum* at the amount of 10^6 spore/ml. Then they were incubated for 30 days at 20°C and 25°C. OTA and CIT were detected in olives within specified time intervals throughout incubation period.

The olives which were incubated at 20°C ve 25°C, OTA was detected with high pressure liquid chromatography (HPLC) at the end of 7., 14., 18., 21. and 30. days of incubation period. OTA formation in black and green olives was found to have maximum values for 21. days. CIT was analysed with TLC at the and of 3., 7. and 14. days of incubation period. CIT was detected neither black olives incubated at 20°C and 25°C nor green olives were incubated at 20°C. CIT formed in green olives incubated at 25°C with an increasing value depending on the time.

Statistical evaluation of results showed that there was no significant difference between incubation temperatures, 20°C and 25°C, for OTA formation in black and green olives ($P \leq 0.05$). Similarly, there was no significant difference between black and green olives for OTA formation at same temperatures ($P \leq 0.05$).

In order to determine the recovery percentages of OTA by the HPLC method and CIT by the TLC method used in this study, olive samples were spiked at 2 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$), 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb and 50 ppb OTA and 200 ppb CIT standard solutions. The recovery of OTA and CIT were found to be 69.11% and 76.3% respectively.

1.GİRİŞ

Dünyanın en sağlıklı ve bitkisel yağ kaynağı olan zeytinin tarihi günümüzden 8.000 yıl öncesine dayanır. Sofralık zeytin Türkiye, Fas ve Yunanistan'da genellikle kahvaltı, yemek öncesi ve sonrası öğünlerde tüketilirken, İspanya, İtalya ve ABD'de daha çok ara öğünlerde, ikramlarda ve hamur işlerinde özellikle de pizzada kullanılmak üzere tüketilmektedir (Tunalıoğlu, 2003).

Dünyada ekonomik anlamda 37 ülkede zeytin üretimi yapılmaktadır. Türkiye, dünyada dane zeytin üretici ülkeler arasında İspanya, İtalya ve Yunanistan'dan sonra 4. sırada yer almaktadır. Ancak toplam üretiminin %16'sını ihraç edebilmekte, dünya ihracatında son sıralarda yer almaktadır (Anon., 2000b). Bunun en önemli nedenleri, zeytin işletmelerimizin çoğunun küçük ölçekte olması sonucunda standart üretim yapılamaması, teknolojiye yeniliklerin takip edilememesi ve diğer ülkelerin üretim tercihlerine uygun üretimin gerçekleştirilememesidir (Oral ve Heperkan, 1999).

Genelde beton havuzlarda, en az %6-10 tuz içerikli salamura içinde, 6-8 ay fermantasyon yolu ile işlenen zeytinlerin üst yüzeyi mikroorganizmalarca oluşturulan bir zar örtüsü ile kaplanmaktadır. Zaman içinde yaygınlaşan, renk ve kalınlığı değişen bu zarı oluşturan küfler bitkisel dokuların yumuşayıp parçalanmasına neden olmaları yanında, mikotoksinleri oluşturarak tehlike yaratırlar (Göçmen ve diğ., 2000). Küflerin ürün kalitesi ve tüketici sağlığı yönünden bu denli önemli olması, küf kontaminasyonuna ve mikotoksin oluşumuna sebep olan faktörlerin araştırılmasının gerekliliğinin ortaya koymaktadır.

Literatürde zeytin üretimi esnasında salamura yüzeyinde başta *Penicillium* olmak üzere *Aspergillus* ve *Rhizopus* türlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Fernandez ve diğ., 1997). Oral ve Heperkan (1999), zeytinde yaptıkları çalışmada *Penicillium* cinsi küflerin toksin oluşturduğunu belirlemişlerdir. Çeşitli araştırmalarda hem işlenmiş hem de işlenmemiş zeytinlerde ve rafine edilmemiş zeytin yağında okratoksin ve diğer mikotoksinlere (aflatoksine) rastlanmıştır (Eltem ve Öner, 1995). Meriç ve Heperkan (2001) İstanbul'da piyasadan temin ettikleri 42 zeytin örneğinin %80'inde CIT (73-735 ppb) varlığını belirlemişlerdir.

Yapılan alışmada, *P. verrucosum* kültürü ile aşılanan siyah ve yeşil zeytinlerde, OTA ve CIT oluşumu üzerine sıcaklık ve süre faktörlerinin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu faktörlerin kontrolü ile, zeytin üretimi sırasında kf gelişiminin ve mikotoksin oluşumunun belli ölçüde de olsa azaltılabileceği düşünülmüştür. Bu alışma ile hem ülke ekonomisine hem de literatüre katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Zeytin Üretimi

Sofralık zeytinlerin nitelikleri ile ilgili yönetmeliğe göre; sofralık zeytin, kültüre alınmış zeytin ağacı (*Olea Europaea sativa* Hoffg Link) çeşitlerinin işlenebilecek olgunlukta hasat edilen temiz ve sağlam meyvelerinin, belirli teknik usullerle acılığı giderilerek saklanabilen ve ambalajlanarak yemeklik olarak tüketilebilen yeşil, renk değiştirmiş, pembe veya siyah daneleri olarak tanımlanmaktadır (TS-774, 2003).

Tarihi günümüzden 8000 yıl öncesine dayanan zeytinin anavatanı, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ni de içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Ön Asya'dır. Dünyaya yayılışı iki yoldan olmuştur. Birincisi Mısır üzerinden Tunus ve Fas'a, diğeri de Anadolu boyunca Ege Adaları, Yunanistan, İtalya ve İspanya'dır. İlk kültüre alınışı ve ıslahı Samiler tarafından olmuştur (Anon., 2000a). Sofralık zeytin, gelişen günümüz dünyasında en önemli fermente bitkisel üründür (Fernandez ve diğ., 1997).

Sınıflandırma sistemine göre zeytin, Dicotyledoneae sınıfı, Ligustales takımından 20-29 cinse sahip *Oleaceae* familyasına dahildir. Yenilebilir meyvesi olan tek tür, kültür zeytininin dahil olduğu *Olea europaeae*'dir.

Zeytinin hasat dönemi kasım ve mart ayları arasındır. Zeytin ağacının yetişmesi için bölgenin ortalama sıcaklığının yüksek, kışların en düşük -12°C olması gerekir. Zeytin ağaçları kuru iklime, kuraklığa ve şiddetli rüzgara dayanıklıdır. Bunun için Akdeniz bölgesi zeytin ağaçları için ideal bir ortamdır (Yıldız, 2003).

Zeytin, diğeri meyve türlerinden oldukça farklı olarak hasattan hemen sonra tüketilemez. Zeytinin tüketilebilir hale gelmesi için içersindeki doğal acılık maddesi olan oleuropeinin giderilmesi gerekmektedir (Tunalıoğlu, 2003). Şekil 2.1 ve Şekil 2.2'de zeytin ağacı ve meyvesi görülmektedir.



Şekil 2.1: Zeytin Ağacı (Anon., 2005c)



Şekil 2.2: Zeytin Meyvesi (Anon., 2005b)

2.1.1 Dünyada ve Türkiye’de Sofralık Zeytin Üretimi

Tablo 2.1’de görüldüğü gibi zeytin üretimine en fazla alanı İspanya ayırmaktadır. İspanya’yı Tunus, İtalya, Yunanistan ve Türkiye izlemektedir. Ülkemizde zeytin üretimi Ege ve Marmara Bölgeleri’nde yoğunlaşmıştır. Ege Bölgesi’nde yağlık, Marmara Bölgesi’nde sofralık zeytin üretimi hakimdir.

Tablo 2.1: Dünyada ve Türkiye’de Zeytin Üretimine Ayrılan Alanlar, (Ha) (Anon., 2004a)

ÜLKELER	YILLAR				
	2000	2001	2002	2003	2004
A.B.D.	14,570	14,570	14,569	14,570	14,500
Arjantin	35,000	29,000	30,000	33,000	33,500
Fransa	15,617	15,968	17,036	17,352	17,813
İspanya	2,300,000	2,400,000	2,430,582	2,400,000	2,400,000
İsrail	18,740	19,450	18,000	15,000	14,000
İtalya	1,136,627	1,142,579	1,170,362	1,162,789	1,140,000
Meksika	4,327	4,625	4,860	4,900	4,900
Mısır	45,513	47,519	49,888	50,000	50,000
Peru	6,418	6,995	7,231	7,750	7,900
Portekiz	369,162	358,751	359,268	359,862	360,000
Suriye	477,993	488,957	498,981	500,000	500,000
Tunus	1,387,240	1,377,700	1,377,700	1,700,000	1,500,000
Türkiye	594,072	599,400	610,722	614,385	597,000
Yunanistan	781,000	767,144	765,000	765,000	765,000

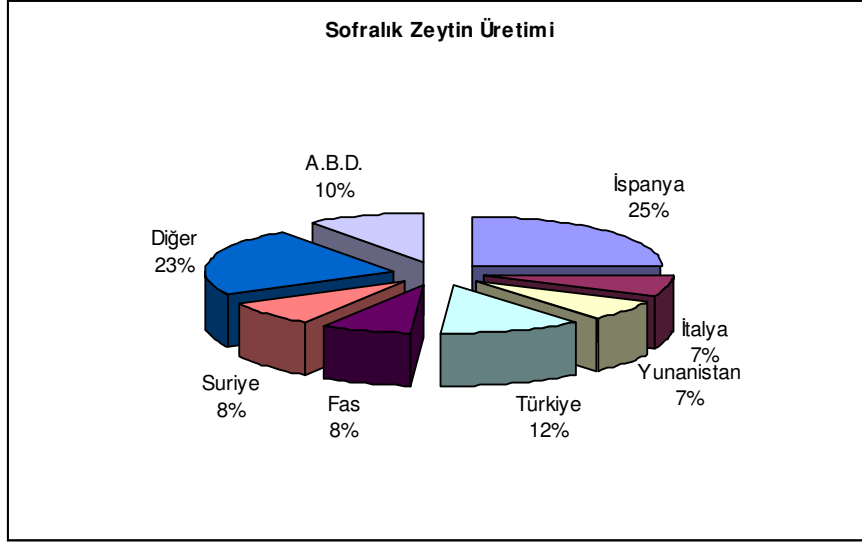
Türkiye’nin toplam tarım alanlarının %3’ünü zeytinlikler oluşturmaktadır (Anon., 2000b). Ülkemizde yaklaşık 600 bin hektar kapalı ve 300 bin hektarı dağınık olmak üzere toplam 900 bin hektar alan üzerinde 88.292.446 adet zeytin ağacı bulunmaktadır. Bu ağaçların 77.936.586 adedi meyve veren, 5.385.881 adet meyve vermeyen yaşıdır (Anon., 2005d). Dünyada zeytin üretimine ayrılan alanlar Tablo 2.1’de verilmiştir.

Dünya zeytin üretimi, sezona bağlı olarak 13-18 milyon ton/yıl değerleri arasında değişkenlik göstermektedir. Dünya zeytin üretiminin yaklaşık %10’u sofralık zeytin olarak işlenmektedir (Kailis ve Harris, 2004).

Dünya sofralık zeytin üretimi son 5 yılda (00/05), önceki 10 yıla (90/99) göre %50 artış göstermiştir. Üretimin büyük kısmı Akdeniz Bölgesi ve Ortadoğu ülkeleri

tarafından yapılmaktadır. Sırası ile İspanya, Türkiye, A.B.D, Suriye, Fas, İtalya ve Yunanistan dünya sofralık zeytininin %77'sini üretmektedir.

Şekil 2.3: Sofralık Zeytin Üretiminin Ülkelere Göre Dağılımı, (93/94 - 02/03) (Anon., 2004b)



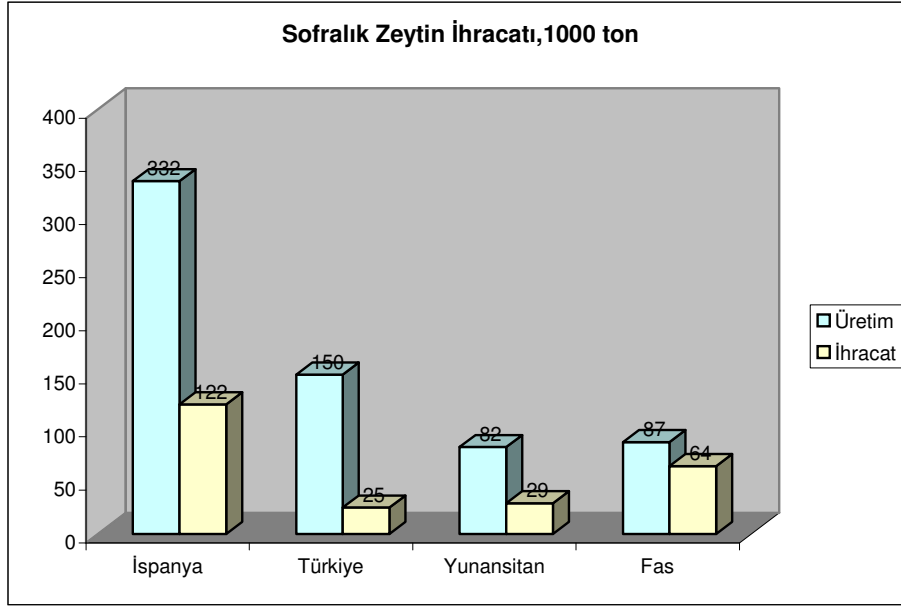
Dünyada, zeytin ağacı varlığına paralel olarak zeytin üreticisi önemli ülkeler, sırası ile İspanya, Türkiye, A.B.D., Yunanistan ve İtalya'dır. Türkiye, sofralık zeytin üretiminde İspanya'dan sonra 2. sırada yer almaktadır. Türkiye zeytin üretiminin %70.6'sını yağlık, %29.4'ünü sofralık olarak değerlendirmektedir. Üretim %71'i Ege Bölgesi'nde yapılmaktadır (Anon., 2000b). Türkiye'de üretilen sofralık zeytinin %85'i siyah, %15'i ise yeşil ve rengi dönüktür (Tunalıoğlu, 2003).

2.1.2 Dünyada ve Türkiye'de Sofralık Zeytin İhracatı

Avrupa Birliği (AB) Ülkeleri başta olmak üzere, Türkiye, Fas ve Suriye toplamda, dünya sofralık zeytin ihracatının ortalama %77'sini gerçekleştirmektedir. Türkiye'nin dünya ihracatındaki payı %10 düzeyindedir (Anon., 2004b). Türkiye'nin tuzlu ve uzun sürede yeme olgunluğuna gelen zeytin işleme tekniklerinde ısrar etmesi ve sofralık zeytin işleme tesislerinin küçük aile işletmeleri yapısında teknolojiden uzak çalışıyor olmaları ve etnik pazarlarda bazı yıllar yaşanan sorunlar Türkiye sofralık zeytin ihracatını sıkıntıya düşürmektedir (Tunalıoğlu, 2003). Başlangıçta ülkemiz ihracatının %100'e yakını Avrupa Birliği Ülkelerine yapılmakta

iken, AB'ye diğer zeytinci ÷lkelerin girmesi ile bu pay giderek dūřmüřtür. Bu nedenle dış satım ortağımız ağırlıklı olarak Ortadođu ÷lkelerine y÷nelmiştir. Fakat bu pazarlarda yaşanan ekonomik koşullardaki bozukluk ihracatımızı olumsuz y÷nde etkilemiştir (Kařka ve diđ., 2005).

şekil 2.4: Sofralık Zeytin İhracatının ÷lkelere G÷re Dağılımı, (93/94 - 02/03) (Anon., 2004b)



Türkiye, dünyanın büyük üretici ÷lkeleri arasında yer almasına karşın, ihracatta aynı başarıyı gösterememektedir. İspanya ürettiği zeytinin yaklaşık %37'sini, Yunanistan %35'ini, Fas %74'ini ihraç ederken, Türkiye ancak %17'sini ihraç edebilmektedir. Fas, ürettiği zeytini dökme olarak ihraç ettiği için, ihracatta dünya sofralık zeytin pazarına İspanya ve Yunanistan'ın hakim olduğu ifade edilebilir (Tunalıoğlu, 2003). Türkiye'nin sofralık zeytin ihracatı konusundaki başarısızlığının temel nedenleri, zeytincilik sektörünün çok küçük, aile işletmeleri yapısında olması, tek düze, teknolojidenden uzak üretim yapılması ve pazarlamada düzensizliklerin olması, uzun yıllar sofralık zeytin standardının uygulamada zorunlu olarak yer almaması, uzun sürede işlenen zeytin ürünlerinin, tuz içeriğinin fazla olması sebebi ile daha çok iç piyasa tüketimine uygun olması, ihracata yönelik işleme tekniklerinin Avrupa Birliği ÷lkelerinden çok, Ortadoğu ÷lkelerinde kabul görmesi ve bu ÷lkelerin yaşadığı ekonomik problemler, acılığa neden olan oleuropeinin tam olarak uzaklaştırılamaması, üretim hataları nedeni ile salamura yüzeyinde oluşan küf

tabakası ve küflerin enzim aktiviteleri sonucu zeytinde olumsuz doku değişimlerine sebep olması ve salamura yüzeyinde gelişen toksijenik küflerin mikotoksin oluşturması olarak sıralanabilir (Tunalıoğlu, 2003; Göçmen ve diğ., 2000).

2.1.3 Dünyada ve Türkiye’de Sofralık Zeytin İthalatı

Sofralık zeytin ithalatında ise, A.B.D., Fransa, İtalya, ve İspanya ilk sırada yer alan ülkelerdir. A.B.D, Brezilya, İtalya ve Fransa İspanyol tarzı salamura yeşil zeytini tercih ederken, Bulgaristan ve Romanya Yunan tarzı salamura naturel siyah zeytin ithal etmektedir (Fernandez ve diğ., 1997).

Tablo 2.2: Dünyada ve Türkiye’de Sofralık Zeytin İthalatı (00/01-03/04) (1.000 ton) (Anon., 2004b)

ÜLKELER	YILLAR				
	2000	2001	2002	2003	2004
A.B.D.	1110	1160	1150	1175	1175
Fransa	264	234	348	257	260
İspanya	19	10	21	27	20
İtalya	38	59	56	88	88
Portekiz	00	00	00	01	01
Tunus	00	00	00	00	00
Türkiye	00	00	00	00	00
Yunanistan	00	15	20	40	90

2.1.4 Sofralık Zeytin Üretim Yöntemleri

Zeytin, oleuropein maddesinin ve diğer fenolik bileşiklerin parçalanmasını ve uzaklaştırılmasını sağlayarak meyvenin acılığını gidermek ve yenebilir hale getirmek amacıyla işlenir (Campaniello ve diğ., 2005).

Dünyada kabul gören sofralık zeytin işleme teknikleri aşağıda listelenmiştir (Fernandez ve diğ., 1997) :

1. İspanyol Sevillian tipi yeşil zeytin, salamurada

2. Kaliforniya tipi siyah zeytin, salamurada
3. Yunan tipi naturel siyah zeytin, salamurada

İlk iki teknikte, acılık giderme işlemleri kostik çözeltisi eklenerek yapılmaktadır. Yunan tipi işlemede ise, zeytinler doğrudan salamura içine yerleştirilmekte, oleuropeinin uzaklaştırılması kısmen ve yavaş bir şekilde sağlanmaktadır. İspanyol tipi işlenen zeytinlerin fermantasyonu laktik asit bakterileri ile sağlanır. Yunan tipi siyah zeytinlerin fermantasyonu ise mayalar ve zeytinin doğal mikroflorasında bulunan çok az sayıdaki laktik asit bakterisi sayesinde (Fernandez ve diğ., 1997).

2.1.4.1 İspanyol Tipi Yeşil Zeytin Üretimi

Yıkama işlemi yapılan olgun yeşil zeytinler, tanklara yerleştirilerek %1-2'lik NaOH (kostik) çözeltisine batırılırlar. Kostik çözeltisi, zeytinin yenebilir kısmının $\frac{3}{4}$ 'üne nüfuz edene dek, yaklaşık 8-12 saat bekletilerek acılığın giderilmesi sağlanır. Çekirdek çevresinde küçük bir bölgenin kostikten etkilenmemesine dikkat edilir. Bu kısımdan fermantasyon sırasında gerekli şeker temin edilir. Zeytinler kesilerek, iç yüzeylerindeki renk değişimine göre kostik çözeltisinin nüfuz etme derecesi belirlenir. Birkaç damla fenol fitalein çözeltisinin kesik zeytin yüzeyine damlatılması ile de ölçülebilir. Yeşil/kahve rengin kırmızıya dönmesi kostik çözeltisinin yeterince işlediğini gösterir (Kailis ve Harris, 2004).

Bu aşamadan sonra, kostik çözeltisi tanktan uzaklaştırılarak zeytinler birkaç kez su ile yıkanır. Böylece kostik çözeltisinin fazlası uzaklaştırılmış olur. Zeytinlerin gereğinden fazla yıkanması, şekerin kaybolmasına ve dolayısı ile fermantasyonun gerçekleşmemesine sebep olur (Kailis ve Harris, 2004).

Yıkanan zeytinlerin bulunduğu tanka %10'luk NaCl çözeltisinden oluşan salamura doldurulur. Bu aşamada laktik asit fermantasyonu başlar. Yetersiz şeker, çok yüksek pH ya da fermantasyonu sağlayan mikroorganizma sayısının azlığı sebebi ile fermantasyon gerçekleşmeyebilir (Kailis ve Harris, 2004).

Bu metotta işlenen zeytinler genellikle 4-5 hafta içinde tüketime hazır hale gelirler. Daha uzun bir bekleme periyodu, 3 aya kadar, fermantasyon çözeltisi ile zeytinler arasında tuz dengesinin oluşmasını sağlayarak lezzet gelişimine katkıda bulunabilir. Bu metodun temel dezavantajı fazla miktarda su gereksinimi ve açığa çıkan atık sudur. İşlenmiş zeytinler, fermantasyonda kullanılan salamura, yeni hazırlanan salamura veya her ikisinin karışımı içinde paketlenir. Son üründe pH : 3.8 – 4.2, serbest asitlik : %0.8 – 1.2 laktik asit cinsinden olmalıdır (Kailis ve Harris, 2004).

2.1.4.2 Kaliforniya Tipi Siyah Zeytin Üretimi

Genelde dönük renkli zeytinlerin farklı kuvvetlerde kostik çözeltilerine batırılmaları yolu ile yapılır. Kostik çözeltisinin, zeytinin çekirdeğine kadar olan tüm kısmına nüfuz etmesi sağlanır. Bu şekilde acılığın giderilmesi hedeflenir. Kostikle işleme sırasında tanktan hava geçirilerek zeytindeki polifenollerin okside olması ve böylece zeytinlerin siyah/kahve renge dönüşmesi sağlanır (Kailis ve Harris, 2004).

Sonraki aşamada, kostik fazlasının giderilmesi için zeytinler su ile yıkanır ve %0.1'lik demir glukonat çözeltisine batırılır. Bu çözelti siyah zeytin rengini stabilize eder. Demir fazlasının giderilmesi için zeytinler tekrar su ile yıkanır (Kailis ve Harris, 2004).

İşlenmiş zeytinler, %2-3'lük NaCl çözeltisinde paketlenir ve sterilize edilir. Zeytinlerdeki demir miktarı 150 mg/kg'ı geçmemelidir (Anon., 2004b). Son üründe pH: 5.8 – 8.0 arasında olmalıdır (Kailis ve Harris, 2004).

Bu metotta fermantasyon işlemi yoktur. Zeytinlerin hasat edildikten 1-2 hafta sonra satışa hazır olması ticari açıdan bir avantajdır. Bunun yanında, kostikle işleme ve yıkama işlemleri için çok miktarda su gerektirmekte ve sonuçta çok fazla atık su çıkmaktadır (Kailis ve Harris, 2004).

2.1.4.3 Yunan Tipi Siyah Zeytin Üretimi

Bu metotta öncelikle yıkanan zeytinler doğrudan %10'luk NaCl çözeltisinden oluşan salamuraya batırılır. Zeytinlerin zamanla tuzu absorbe etmesi ile zayıf bir

fermantasyon gerçekleşir. 6-8 hafta sonunda, salamura ve zeytinlerin tuz miktarı %8-10 seviyesinde dengeye ulaşır. Salamurada bekletme işlemi sırasında oleuropein ve diğer fenolik maddeler zeytinden uzaklaştırılırken, suda çözünen şeker, vitaminler ve minerallerde kayıp olur (Kailis ve Harris, 2004).

Zayıf gelişen fermentasyon sırasında, şeker laktik asit, asetik asit, alkol ve diğer maddelere dönüşerek zeytinin tadı gelişir. Bu işlem zeytinin çeşidi, olgunluk derecesi, sıcaklık, tuz ve salamuranın pH'sına bağlı olarak 3-12 ay sürer. İşlem süresi zeytinlerin sıcak su ile kısmen haşlanması ve kostik çözeltisine batırılması ile kısaltılabilir. Zeytinlerin çizilmesi veya dilimlenmesi acılık giderme işlemi hızlandırır. Zeytinler, fermentasyonda kullanılan salamura, yeni hazırlanan salamura veya her ikisinin karışımı içinde paketlenir (Kailis ve Harris, 2004).

Son üründe pH: 4.5 – 4.8, serbest asitlik %0.1 – 0.6 laktik asit cinsinden olmalıdır. Bu metodun avantajı, işlem kolaylığı ve az su gerektirmesidir (Kailis ve Harris, 2004).

2.1.5 Fermentasyon Sırasında Zeytinlerde Görülen Mikrobiyolojik ve Kimyasal Değişiklikler

2.1.5.1 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 salamuraya konmaktadır (Lund ve diğ., 2000). Zeytindeki şekerler, vitaminler ve amino asitler osmoz ile salamura solüsyonu içersine geçmektedir. Salamura yavaş yavaş laktik asit fermentasyonu oluşturan mikroorganizmaların gelişimi için uygun bir besi ortamına dönüştürülmektedir (Robinson, 2000).

Fermentasyonun ilk aşamalarında, Gr (-) 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). Fermantasyon ilerledikçe, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* spp. türleri görülür ve fermantasyonun ikinci aşamasında *Lactobacillus plantarum* ve daha az miktarda *Lactobacillus delbrückii* ortama hakim olmaktadır (Lund ve diğ., 2000). Fermantasyonun ilk aşaması pH 6'ya düşünceye kadar devam etmektedir (Wood, 1998). Fermantasyonun 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. İlginç bir şekilde salatalık fermantasyonunun tersine zeytin fermantasyonunda *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* türlerinin gelişiminden önce gözlenebilir. Bu olay, tuz konsantrasyonundan ya da polifenollere dirençten dolayı gerçekleşebilir (Lund ve diğ., 2000).

Fermantasyonun üçüncü aşaması substrat tükenene kadar devam etmektedir. Yaklaşık olarak 25 gün sürer. *Lactobacillus* türleri (özellikle *Lb. plantarum*) dominant haldedir ve maya florası ile birlikte yaşamaktadır. *Lactobacillus plantarum*, gelişmesi için vitamin ve aminoasitlere ihtiyaç duymaktadır. Bazı mayalar ortama B vitamini sentezlemektedir. Fermentatif mayalar, fermente olabilir şekerlerin önemli bir kısmını kullanmaktadır. Bunların etanol, etil asetat ve asetaldehit gibi metabolitleri, ürünün karakteristik doğal özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Oksidatif mayalar, yüzeysel filmler olarak bulunabilirler. Bunlar laktik asidi okside ettiği, pH'yı yükselttiği ve bu suretle *Clostridium* spp. tarafından kötü koku oluşumu ile bozulmaya neden olduklarından anaerobik koşulların sağlanması ile düşük miktarlarda tutulmalıdır. Oksidatif mayaların baskılanması, salamura yüzeyinin plastik filmlerle kaplanması ile gerçekleştirilebilir. Fermantasyonun sonunda, muhtemel *Propionibacterium* (pH'nın artmasına ve koku oluşumu ile bozulmaya neden olabilir) gelişiminin baskılanması için, tuz konsantrasyonu %8'e yükseltilir (Lund ve diğ., 2000).

2.1.5.2 Konserve Zeytin Fermantasyonu

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 fermantasyona uğratılabilir. Salamura içerisinde depolama esnasında hava enjeksiyonu ile oksidasyonun gelişmesi sağlanabilir. Salamuranın tuz konsantrasyonuna ve fenol seviyesindeki genetiksel farklılıklara bağlı olarak, mayalar ve laktik asit bakterileri fermantasyonda baskın halde bulunabilirler. Oksidasyon uygulaması öncesinde laktik asit fermantasyonu ile tam bir koruma sağlanmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

Karartma işlemi için meyveler tekrar eden bir şekilde sodyum hidroksit solüsyonu (%1-2) ve içersine basınç altında hava enjekte edilmiş olan su ile muamele edilmektedir. Genellikle bu işlemler 3 ile 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 bağlı olarak gerçekleşmektedir. Oksidasyon hızı, alkalilik miktarındaki artışa bağlı olarak artmaktadır. Oluşan renk stabil olmayıp, renkteki bozulmaların önlenmesi için demirli glukonat ya da laktat solüsyonları eklenmektedir. Demir renk üzerine etkisinin yanı sıra, kalsiyum gibi olgun zeytin dokusunun korunmasında da 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).

2.1.5.3 Naturel Siyah Zeytin Fermantasyonu

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

İlk günlerde Gr (-) bakteriler bulunur ancak 1-2 hafta sonra yok olmaktadır. Bu fermantasyonda mayalar baskındır ve 10-25 gün sonra sayıları maksimuma ulaşmaktadır. Fermentatif mayalar arasında *Torulopsis candida*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida diddensii* ve *Pichia membranaefaciens*'in oksidatif türleri yer almaktadır. Ancak *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve ileri dönemlerde *Lactobacillus* türleri gelişmekte ve asit üretmektedir (Lund ve diğ., 2000).

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

Asit konsantrasyonu %0.3-0.5 arasında değiştiiği halde, son pH 4.3-4.5 arasındadır. Bu nedenle, fermantasyonun sonunda tam bir korumanın sağlanabilmesi için, tuz konsantrasyonu %8-10'a yükseltilmelidir (Lund ve diğ., 2000).

2.2 Zeytinlerde Görülen Bozulmalar

Zeytinler, hasattan sonra, sofraya ulaşınca kadar geçen süre içinde kaliteyi olumsuz yönde etkileyen fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik değişikliklere uğrayabilmektedir (Korukoğlu ve diğ., 2000).

İstenmeyen koku oluşumu, gaz cebi oluşumu, bütirik ve propiyonik asit fermantasyonları, renk bozuklukları, yumuşama ve küf gelişimi zeytin kalitesine etki eden problemlerdir (Fernandez ve diğ., 1997).

2.2.1 Siyah Zeytinlerde Görülen Bozulmalar

2.2.1.1 Zar Oluşumu

Siyah zeytin fermantasyon tanklarının, özellikle üstü açık beton tankların yüzeyinde sıcak havalarda üreticinin "kefeke" olarak adlandırdığı bir zar oluşmaktadır. Bu zarda pek çok maya, küf ve bakteri bulunmaktadır. Zarda bulunan bu karışık mikroorganizmanın her evrede hakim olanı değişmekte, buna paralel olarak zarın renk, şekil ve kalınlığı da değişmektedir. Örneğin, salamuraların kurulmasından bir ay kadar sonra oluşan kirli-beyaz renkli zar, baharda havaların ısınmaya başlaması ile fıstiki yeşil renk olmakta daha sonra yer yer kalınlaşıp beyaz-gri renk kazanmaktadır. Havalar ısındıkça pembeleşmeye başlayan zar bir süre sonra kiremit kırmızısı rengini alıp daha sonra tekrar kirli gri renge dönüşmektedir. Salamura tanklarının yüzeyinde oluşan zar zamanında uzaklaştırılmadığı takdirde, zarda bulunan mikroorganizmalar salamuradaki laktik asidi parçalayarak asit miktarını düşürürler. Asit miktarının düşmesi salamurada pektin parçalayan mikroorganizmanın çalışmasını kolaylaştırır ve zeytinlerin yumuşamasına neden olur. Zar oluşumu en iyi olarak uygun kapların kullanılması ile önlenir (Anon., 2005a).

2.2.1.2 Yumuşama

Bu bozulma kefekenin uzun süre salamura yüzeyinde bırakılması sonucu oluşabildiği gibi, fermantasyonda yeterli asit oluşmaması ve tuz miktarının düşük olması sonucunda da ortaya çıkar. Tuz ve asit miktarının düşük olması durumunda pektin parçalayan mikroorganizma çalışarak zeytin danesinin iskelet maddesi olan pektini parçalar, dane yumuşar. Yumuşama ilerlediği takdirde dane hücreleri parçalanacağından kokuşma yapan ve yağ asitlerini parçalayıp acılaştırma yapan mikroorganizmaya çalışma ortamı sağlanmış olur. Üretici arasında "yağlanma" olarak adlandırılan bu durum aslında zeytin danesinin çürümesidir. Bu duruma fırsat vermemek için tanklarda uzun süre bekleyecek zeytinlerin salamuralarında sürekli

olarak asit ve tuz kontrolü yapılmalı, gerekiyorsa dışarıdan tuz ve asit eklenmelidir (Anon., 2005a).

2.2.1.3 Sünme

Sıcak depolarda ve toprak üstü tanklarda muhafaza edilen siyah zeytinlerin salamuralarında, yaz aylarında eğer tuz ve asit miktarı düşük ise sünme hastalığı görülür. Salamuraya el sokulup çekildiğinde, salamura parmaklarının ucunda uzar. Bu durum görüldüğünde asit ve tuz kullanarak yeni bir salamura hazırlanmalı ve zeytinler bu yeni salamuraya konulmalıdır (Anon., 2005a).

2.2.2 Yeşil Zeytinlerde Görülen Bozulmalar

2.2.2.1 Zar Oluşumu

Siyah zeytinlerde olduğu gibi üzeri açık kaplarda yapılan salamuralarda görülür. Salamuranın üzerinde beyaz-krem rengi bir zar oluşur. Zar oluşumu yabani mayaların çalışmasına bağlı olarak meydana gelir. Ancak uzun süre salamura yüzeyinde kalırsa bu zarda küfler ve bakteriler de çalışmaya başlar. Zarın zeytinlerde oluşturduğu zararlar ve önlenmesi için, öncelikle kapalı tanklar kullanılmalı, işlenmesi bitmiş zeytinler üstü açık tanklarda bekletilmemelidir. Ambalajlamada tepe boşluğu minimum olacak şekilde veya vakumlu kapatma yapılmalıdır. Zar oluşumunu önlemenin bir diğer yolu da litreye 0,5 g sorbik asit vermektir (Anon., 2005a).

2.2.2.2 Kararma

Bu bozulma alkali ile muamele ve yıkama sırasında hava teması ile oluşur. Bunu önlemek için zeytinlerin bu işlemler sırasında hava ile teması en aza indirilmelidir. Diğer bir kararma nedeni kullanılan suda demir bulunması veya kaplardan salamura ve zeytinlere demir bulaşmasıdır. Yeşil zeytin üretiminde demirli sular veya demir kaplar kullanılmamalıdır. Demir zeytinde bulunan polifenollerle birleşerek siyah renkli demirtannat oluşturur. %1-2 sitrik asit içeren salamurada bekleterek az

kararmış zeytinlerin rengi düzeltilebilir. Ancak kararma fazla ise bu işlemin yararı olmaz (Anon., 2005a).

2.2.2.3 Gaz Cebi Oluşumu

Yeşil zeytinlerde kabarcık oluşumu alkali sıcaklığının ve konsantrasyonunun yüksek olması sonucu oluşur. Dane kabuğu ile epidermis arasında oluşan bu kabarcıklar zeytinin görünümünü bozar, piyasa değerini düşürür (Anon., 2005a).

Zeytinlerin kabuk altında çekirdeğe kadar uzanan yarıklar şeklinde oluşan ve dışarıdan kesecikler şeklinde görülen bozulma, fermantasyonun başlangıcında *Aerobacter* grubu bakterilerin fazla çalışması ile meydana gelir. Gaz cebi oluşumunu önlemek için starter kullanılmalı veya salamuraya başlangıçta asit katılmalıdır. Böylece gaz yapan bakterilerin çalışması güçleştirilmiş, laktik asit bakterilerinin ortama hakim olması sağlanmış olur (Anon., 2005a).

Alkali ile muamele sırasında çözeltiye % 3-6 oranında tuz ilave edilmesi kabarcık ve çep oluşumunu önlemektedir. Bu tür bozulmanın oluşmaya başladığı farkedilirse salamuraya % 0,5 laktik asit veya % 0,25 asetik asit konulmalıdır (Anon., 2005a).

2.2.2.4 Bütirik Asit Kokması

Salamurada bütirik asit bakterilerinin (*Clostridium butyricum*) faaliyet göstermesi ile oluşur. Bu bozulma bütirik asidin kötü kokusu ile farkedilir. Şekerler bütirik aside parçalanır. Fermantasyonun başlangıç aşamaların da görülen bu bozulmanın önlenmesi için kokuşan salamura süratle uzaklaştırılmalı, zeytinler yıkanmalı ve %7-8'lik asitlendirilmiş salamura konulmalıdır (Anon., 2005a).

2.2.2.5 Zapatera Hastalığı

Bu bozulmaya uğrayan zeytinler eski deri kokusu kazanır. Fermantasyonun son aşamalarında görülen bu bozulma, yeterli asit oluşmadığı ve pH'nın 4.2'nin altına düşmediği durumlarda görülür. Bu bozulmayı *Propiono bacterium* ve bazı *Clostridium* türleri yapar. Bu bozulmayı önlemek için pH 4,0'a düşmelidir.

Gerekirse ortama şeker, laktik veya asetik asit ilave edilerek pH düşürülür ve zeytinlerin bozulması önlenir (Anon., 2005a).

2.2.2.6 Beyaz Noktalar

Yeşil zeytinlerde bazen kabukların altında beyaz noktalar görülür. Bunlar *Lactobacillus plantarum* tarafından oluşturulan kolonilerdir. Bu noktaların büyüklüğü ve sayısı çok değişik olabilir. Yeşil zeytinlerin yalnızca görünüşü üzerinde etkili olan beyaz noktaların oluşmaması için alkali çözeltisi sıcak olmamalı ve fermantasyonun başında asit ilavesi yapılmalıdır (Anon., 2005a).

2.2.2.7 Yumuşama

Bu bozulma %5'in altındaki tuz konsantrasyonlarında ve yetersiz laktik asit (%0,5 ve daha az) bulunması durumunda görülür. Daneler özellikle sap tarafından başlayarak yumuşar. Yumuşama siyah zeytinlerde olduğu gibi küf ve bakterilerin salgıladığı pektolitik enzimlerin etkisi ile doku maddesi pektinin parçalanması sonucu oluşur. Zeytinlerde yumuşama başladığı farkedilirse hemen asit ve tuz ilavesi yapılmalıdır (Anon., 2005a).

2.3 Küf Gelişimi ve Mikotoksin Oluşumu

Günümüzde gıda ve gıda hammaddelerinde küflenme, yalnızca ürünün verimi ve kalite kaybı yönünden değil, tüketici sağlığı yönünden de önem kazanmıştır. Bu durum gıdalarda küf sorunu ile ilgili çalışmalarını arttırmıştır.

Mikotoksinler küfler tarafından üretilen doğal metabolitlerdir. İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde kanserojenik, mutajenik, nefrotoksik ve hepatotoksik etkilere neden olmaktadır. Gıdalarda küflerin gelişimine ve mikotoksin üretiminde; nem, su aktivitesi (aw), sıcaklık, substrat bileşimi, pH, rekabetçi küf ve mikroorganizma gelişimi, bitki üzerindeki stres (kuraklık, mekanik hasat ekipmanlarının, böcek ve dolunun tohumda neden olduğu hasar) etkilidir (Robinson, 2000).

2.3.1 Mikotoksinlerin Oluşumunda Etkili Faktörler

Gıdalarda küf kolonizasyonunu ve/veya mikotoksin oluşumunu birbiri arasında çeşitli etkileşimlere sahip birçok faktör etkilemektedir. Bu faktörler; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırılmaktadır. Fiziksel faktörler, küf kolonizasyonunun ve mikotoksin üretiminin gerçekleştiği sıcaklık, bağıl nem, ve böcek istilası gibi çevresel koşulları içerir. Fungisit ve/veya gübre kullanımı ise kimyasal faktörler olarak gösterilmektedir. Kuraklık, sıcaklık artışı, bağıl nem artışı gibi bitki üzerinde stres yaratan durumlar mikotoksijenik küfün kolonizasyonunu ve metabolizmasını dolayısı ile mikotoksin üretimini değiştirebilir. Biyolojik faktörler, toksijenik küfün kolonizasyonu ve küf ile substrat arasındaki etkileşimlere dayanır. Küfün cinsi, spesifik suşu, suşun çeşitliliği ve toksijenik özellikleri gibi iç faktörler de biyolojik faktörler içinde sınıflandırılmaktadır. Bazı bitkisel ürünler küf kolonizasyonuna daha yatkındır. Bununla birlikte, çevresel koşullar diğer dayanıklı bitkisel türlerin küflere karşı hassasiyetini arttırabilmektedir. Ayrıca, küf gelişimi için optimum olarak belirlenen koşulların, mikotoksin üretimi için önemli olmadığı belirlenmiştir (Hussein ve Brasel, 2001).

Mikotoksin oluşumunda en önemli faktörler, üretici küfün fizyolojisini etkileyen sıcaklık, su aktivitesi (a_w), substrat bileşimi olarak sıralanmaktadır (Ringot ve diğ., 2005).

2.3.2 Zeytinde Küf ve Mikotoksin Oluşumu

Uygulanmakta olan teknoloji sebebi ile en fazla küflenme görülen besinlerimizden biri salamura siyah zeytindir (Göçmen ve diğ., 2000).

Zeytinlerde küf gelişimi, küfün meyve eti içersine girişi ile başlamaktadır. Bunu misel gelişimi ve mikotoksin oluşumu takip etmektedir (Fernandez ve diğ., 1997).

Yapılan araştırmalar sonucunda zeytinlerin küf florasının ağırlıklı olarak *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsine ait küflerin oluşturduğu belirlenmiştir (Gourama ve Bullerman, 1988, Kıvanç ve Akgül, 1990, Eltem ve Öner, 1995, Şahin ve diğ., 1996 ve 1999, Fernandez ve diğ., 1997, , Göçmen ve diğ., 2000, Arıcı, 2001, Meriç ve Heperkan, 2001).

Göçmen ve diğerleri (2000), yaptıkları çalışmalarda, *Penicillium* cinsinin en fazla rastlanan küf cinsi olduğu, diğer cinslerin ise, *Aspergillus*, *Clodosporium*, *Alternaria*, *Eurotium*, *Paecilomyces*, *Ulacladium*, *Rhizopus*, *Phoma* ve *Thalaromyces* oldukları belirlenmiştir.

Eltem ve Öner (1995), Ege ve Marmara bölgelerinden 55 farklı salamura siyah zeytin örneğinin küf florasını incelemişlerdir. Farklı 30 küf suşu elde etmişlerdir. Bu izolatlardan 15'i *Penicillium*, 12'si *Aspergillus*, 2'si *Alternaria*, 1'i de *Clodosporium*'a aittir.

Piyasada satılan salamura siyah zeytinlerin küf florasını ve mikotoksin varlığını belirlemek amacı ile Şahin ve diğ. (1999) yaptıkları çalışmada, salamura örneklerinden 63 adet ve zeytin örneklerinden 33 adet olmak üzere toplam 96 küf suşu izole ederek identifiye etmişlerdir. Salamuradan izole edilen küflerin %68.25'i *Penicillium* cinsine, %15.87'si *Aspergillus* cinsine ve kalan %15.88'lik kısmı ise diğer türlere aittir. Satışa hazır zeytinlerin küf florasını sadece *Penicillium* cinsine ait türler oluşturmuş ve 11 farklı tür izole edilmiştir. *P. verrucosum*'a zeytinlerde rastlanma sıklığı %9.09'dur.

Salamura siyah zeytinlerde yapılan bir çalışmada, salamurada 63 küf suşu izole edilmiştir. Bunlar, *P.aurantiogriseum*, *P.camamabertii*, *P.chrysogenum*, *P.citrinum*, *P.commune*, *P.crustosum*, *P.echinulatum*, *P.expansum*, *P.funiculosum*, *P.glandicola*, *P.griseofulum*, *P.islandicum*, *P.oxalicum*, *P.roquefortii*, *P.verrucosum* ve *P.viridicatum* olarak bildirilmiştir (Meriç ve Heperkan, 2001).

Şahin ve diğerleri (1999), zeytinlerde yaptıkları mikotoksin taramasında 20 örneğin tamamının mikotoksinlerle bulaşık olduğunu belirlemişlerdir. Tespit edilen mikotoksinler, aflatoksin B₁/ B₂/ G₁/ G₂, CIT, OTA, sterigmatosistin, patulin, penisilik asit, luteoskrin ve siklopiazionik asittir.

2.4 Mikotoksinlerle İlgili Yasal Düzenlemeler

Ülkemizde ve AB’de CIT için henüz kabul edilmiş bir limit yoktur. Okratoksin A için kabul edilen maksimum limitler, işlenmemiş tahıl tanelerinde (çeltik ve karabuğday dahil) 5µg/kg (ppb), tahıllardan elde edilen bütün ürünlerde (tahıl bazlı işlenmiş ürünler ve doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl tanelerinde 3µg/kg, kuru üzümde 10 µg/kg’dır (Tebliğ 2002/63, 2003).

Avrupa Birliği’nin kabul ettiği direktiflere, göre maksimum OTA seviyesi, tahıl ve tahıl ürünleri ve ham tahıl tanelerinde 5.0 µg/kg (ppb), tahıl içeren ürünlerde ve doğrudan tüketime sunulan tahıl tanelerinde 3.0 µg/kg, çekirdeksiz kuru üzümde 10.0 µg/kg, kavrulmuş kahve çekirdeği, öğütülmüş ve kavrulmuş kahvede (çözünebilir kahve hariç) 5.0 µg/kg, çözünebilir veya hazır kahvede 10.0 µg/kg, şaraplarda, üzüm suyu ve üzüm suyu içeren ürünlerde 2.0 µg/kg, bebek gıdaları, küçük ve yetişkin çocuklar için üretilmiş tahıl bazlı gıdalarda ve yetişkinler için üretilen özel amaçlı diyet gıdalarda 0.50 µg/kg olarak belirlenmiştir (EC 123/2005, 2005).

Genelde CIT ile birlikte bulunan OTA için Brezilya’da mısır, pirinç, arpa ve baklagiller için 50 ppb, Çekoslovakya’da gıdaların tümü için 20 ppb ve çocuk maması için 1 ppb, Romanya’da tüm gıdalar ve yemler için 5ppb olarak limit belirlenmiştir (Karadeniz ve Ekşi, 2002).

2.5 *Penicillium verrucosum*’un Özellikleri

Penicillium verrucosum düşük sıcaklıklarda, optimum 20°C civarında gelişen bir türdür. 0-31°C aralığında, su aktivitesi 0.80’nin altında gelişebilir. Yaygın olarak serin iklimlerde görülmekle birlikte, ılık iklimlerde ve tropikal bölgelerde de rastlanabilir (Aroyyo ve diğ., 2005; DeVries ve diğ., 2002).

Penicillium verrucosum, 25 mm’den küçük, sarı-yeşil, genellikle derin koloniler oluşturur (Pitt, 1997). YES agar bazlı besiyerlerinde, tersten bakıldığında tipik kahverengi koloniler görünümündedir (Chelkowski, 1991).

Penicillium. verrucosum’un başlıca gıda habitatu tahıllardır. Serin iklimlerde, özellikle Avrupa’nın kuzeyinde ve merkezinde, Kanada’da yetişen tahıllarda yaygın olarak *P. verrucosum*’a rastlanmaktadır. Kırmızı et ürünleri ve peynirde de bulunur.

Yaygın olmasa da ılık iklimlerde yetişen çeşitli gıdalarda da görülmektedir (DeVries ve diğ., 2002; Benford ve diğ., 2001). Türkiye’de yapılan araştırmalarda peynirde (Özkalp ve Durak, 1998), zeytinlerde (Şahin ve diğ.,1999, Oral ve Heperkan, 1999, Meriç ve Heperkan, 2001) *P. verrucosum* tespit edilmiştir.

Danimarka’da domuzlarında nefrit hastalığı tespit edilen bir çiftlikten alınan 70 arpa örneğinden, 67’sinde yüksek miktarda *P. verrucosum* ‘a rastlanmış, 66 örneğin OTA ile kontamine olduğu bulunmuştur (DeVries ve diğ., 2002).

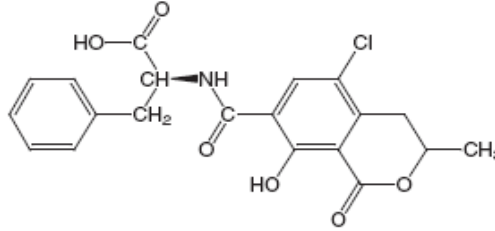
Penicillium verrucosum’un toksijenik özellikte olup, gıdalarda CIT ve okratoksin ürettiği bildirilmiştir (Chelkowski, 1991; Samson ve diğ., 1996; DeVries ve diğ., 2002). Bu iki mikotoksin, toksikoloji ve patolojide benzerlikler göstermektedir (Vrabcheva ve diğ., 2000). Sitrinin ve OTA sinerjistik etki göstermektedir. Bu nedenle teratojenite ve kanserojenite üzerine yapılan çalışmalarda birlikte test edilmektedirler. Test hayvanlarında iki mikotoksinin de teratojen ve nefrotoksik özellik gösterdiği belirtilmektedir (Truckness ve Pohland, 2000).

2.6 Okratoksin A

Okratoksin A, küfler tarafından doğal olarak üretilir. Grubundaki en toksik mikotoksindir. En önemli OTA üreten tür *Aspergillus ochraceus*’tur. OTA üreten *Penicillium* türleri, *P. verrucosum* ve *P. nordicum*’dur. İlk olarak 1965 yılında, toksijenik küflerin laboratuvar koşullarında taranması sırasında *Aspergillus ochraceus*’tan izole edilmiştir (Anon., 1991; Hussein ve Brasel, 2001; Ringot ve diğ., 2005).

Okratoksin A’nın kimyasal yapısı Şekil 2.5’te görülmektedir. Molekül formülü $C_{20}H_{18}O_6NaCl$ ’dir. Molekül ağırlığı 403.82 gr ve erime noktası 90-171°C’dir. Beyaz renkte, kokusuz, kristal halde bir bileşiktir. Polar organik çözügenlerde çözünürlüğü yüksektir. Suda hafif çözünür. UV ışık altında, OTA’nın asit çözeltileri yeşil, baz çözeltileri mavi renklidir. Okratoksin A, ışığa ve havaya karşı dayanıksızdır. Işık ile çok kısa süreli teması bile, özellikle nemli koşullarda niteliğinin bozulmasına sebep olur. Etanol çözeltileri, buzdolabında ve karanlıkta saklandığında 1 yıldan fazla süre stabil kalabilir. Isıya karşı oldukça stabildir. Okratoksin A ile kontamine tahıl

ürünlerinin, 3 saat otoklavlanma işlemi sonucunda %35'i stabil kalabilir (Anon., 1991; Pohland ve diğ., 1992; Ringot ve diğ., 2005).



Şekil 2.5: Okratoksin A'nın Kimyasal Yapısı (Anon., 1991)

2.6.1 Okratoksin A Üreten Küfler ve İzole Edildiği Gıdalar

Okratoksin A, serin ve ılık iklimlerde temel olarak *P. verrucosum* ve *P. nordicum* tarafından üretilir. *Penicillium verrucosum*'un ürettiği OTA ile kontamine olan başlıca gıda grubu tahıllardır. *Penicillium nordicum* ise et ürünleri ve peynirde tespit edilmiştir. Tropikal ve yarı tropikal bölgelerde ise OTA, *Aspergillus ochraceus* tarafından üretilir. Sert kabuklu yemişler, kurutulmuş yerfıstığı, fasulye, baharatlar, yeşil kahve çekirdekleri, kurutulmuş meyveler ayrıca işlenmiş etler, tütülenmiş ve tuzlanmış balık *A.ochraceus*'un izole edildiği gıdalar arasındadır. *Aspergillus*'un diğer iki türü, *A. niger* ve *A. carbonarius*'un da OTA ürettiği bildirilmiştir. Sıcak bölgelerde tahıllar, yağlı tohumlar ve karışık yemlerde bu türlere rastlanmaktadır. *A.carbonarius*'un yaş ve kuru üzüm ve kahvede yaygın olduğu bilinmektedir. *A. lacticofeatus* ve *A. scleratoniger*'in de OTA üretimi araştırılmaktadır. Bununla birlikte, soğandan izole edilen *A. alliceus*'un laboratuvar koşullarında OTA ürettiği rapor edilmiştir. Ayrıca bu türün, Kaliforniya'da incirlerde ve Arjantin'de baharatlarda OTA ürettiği belirlenmiştir (Ringot ve diğ., 2005). Dünyada çeşitli ülkelerde, tahıl ve tahıl ürünleri, yeşil ve kavrulmuş kahve, kurutulmuş meyveler, şarap, üzüm suyu, kakao ve çikolata, baharatlar, konserve gıdalar, bitkisel yağlar, zeytin, baklagiller, nohut, mercimek ve soya ürünleri, süt ve süt ürünleri, et, böbrek, karaciğer, bira, çay, sirke, hardal, bebek gıdaları ve ev tozlarında OTA tespit edilmiştir (Pohland ve diğ., 1992, Benford ve diğ.,2001).

2.6.2 Okratoksin A'nın Biyolojik Etkileri

Okratoksin A, hayvanlarda nefrotoksik, hepatotoksik, immunotoksik ve teratojenik olarak nitelendirilmektedir. Fare ve sıçanlarda böbrek ve karaciğer tümörlerinin sebebi olarak gösterilmektedir. Bitkisel gıdalarda doğal olarak bulunması sebebi ile, hayvansal kaynaklı ürünlerde de rastlanır ve insanlara bulaşır. Okratoksin A, insanlar için genotoksik ve kanserojen olarak bildirilmektedir (Ringot ve diğ., 2005). Fenilalanin metabolizmasında bozulma, fosfo enol purivat karboksi kinaz enziminde azalma, karbonhidratlardan yağ üretiminin azalma ve protein/DNA sentezinin inhibisyonu gibi biyokimyasal fonksiyon bozukluklarına sebep olur (Speijers ve Speijers, 2004).

Okratoksin A akut ve sub-akut toksisitesinde bir çok farklı mekanizma görülmektedir. Protein sentezi inhibisyonu, membran peroksidasyonunu hızlandırma, kalsiyum hemostazının bozulması, mitokondrial solunumun engellenmesi ve DNA'nın hasarlanması başlıca etkileridir (Ringot ve diğ., 2005).

Okratoksin A kan, karaciğer ve böbreklerde etki gösterir. Karaciğer ve böbrek, OTA biotransformasyonunun gerçekleştiği başlıca organlardır (Ringot ve diğ., 2005).

Pohland ve diğerleri (1992) yaptıkları çalışmada, OTA'nın toksisitesinin tür, cinsiyet ve alınma yoluna bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. LD₅₀ değeri beyaz tavuklarda 3,4 mg/kg vücut ağırlığı seviyesinden, erkek farelerde 30.3'e kadar uzanır. Dişi farelerin erkeklerine göre daha hassas olduğu, karın boşluğuna enjeksiyon yolu ile alımının, ağızdan alımından daha etkili olduğu belirlenmiştir. Böbrekler, hedef organdır. Diğer etkilerinin yanısıra böbreklerde fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler yapar. Sıçanlarda karaciğer ve kalp morfolojisinde ve kan pıhtılaşma faktöründe anormalliklere sebep olduğu belirlenmiştir. Farelere karın boşluğuna 40 mg/kg vücut ağırlığı düzeyinde karın boşluğuna enjekte edilerek, tavuklara diyetle birlikte 2-4 mg/kg düzeyinde ağızdan verilerek yapılan incelemeler sonucunda, miyelotoksik etki yaptığı görülmüştür. Piliçlerin 3 hafta süresince 2.8 mg/kg vücut ağırlığı seviyesinde OTA içeren diyetle beslenmesi sonucunda barsaklarında hasarlanmalar tespit edilmiştir. Öğünle birlikte 1.0 mg/kg OTA alan

beyaz tavuklarda yumurta üretiminin %14 azaldığı gözlenmiştir. 14 gün süresince günlük olarak 5.6-20 mg/kg vücut ağırlığı düzeyinde OTA alan gine domuzlarında gastrointestinal sistemde, böbreklerde ve lenfoid dokuda fonksiyon değişiklikleri görülmüştür. Günlük 800 µg/kg vücut ağırlığı dozunda OTA ile 5 gün beslenen domuzların böbrek yapıları incelendiğinde membran yapının kaybolduğu belirlenmiştir. Memeli canlılarda OTA'nın sindirime uğradıktan sonra dokularda yarılanma ömrünün uzun olması, kandan atılma hızının yavaş olması ve biyolojik açıdan işlenirliği yüksek bir toksin olması toksisitesine katkıda bulunmaktadır.

Tablo 2.3: Okratoksin A'nın LD₅₀ Değerleri (Orme ve Kegley, 2004)

<u>ALINMA YOLU</u>	<u>TÜRLER</u>	LD₅₀
Karın zarına enjeksiyon	Fare	22.0 mg/kg
Karın zarına enjeksiyon	Sıçan	12,600 µg/kg
Damar içine enjeksiyon	Keçi, koyun	1.00 mg/kg
Damar içine enjeksiyon	Fare	25,710 µg/kg
Damar içine enjeksiyon	Sıçan	12,750 µg/kg
Ağızdan	Tavuk	3,300 µg/kg
Ağızdan	Köpek	200.0 µg/kg
Ağızdan	Fare	46.0 mg/kg
Ağızdan	Domuz	1.00 mg/kg
Ağızdan	Sıçan	20.0 mg/kg
Deri altına enjeksiyon	Tavuk	11.0 mg/kg

Okratoksin A'nın kanserojenik etkisi ilk olarak 1971 yılında bildirilmiştir. Haftada 5 gün olmak üzere toplam 50 hafta boyunca 300 mg OTA verilen sıçanlardan birinde böbrekte hamortoma gelişimi görülmüştür. 45 hafta boyunca 40 mg/kg OTA içeren diyetle beslenen erkek farelerde böbrek ve karaciğerde tümörlere rastlanmıştır. Fareler 50. haftada ölmüştür. 20 ay boyunca 40 mg OTA/kg içeren öğünle beslenen 40 adet B6C 3F1 fare üzerinde yapılan bir çalışmada 24 faredede böbreklerde kanserli doku oluşumu gözlenmiştir. Erkek farelerle aynı şekilde beslenen dişi farelerde ise nefropati görülmüş ancak böbreklerde tümör oluşumu tespit edilmemiştir. Okratoksin

A içeren diyetle beslenen dişi ve erkek farelerde karaciğerde yavaş gelişen türden tümörler oluştuğu bulunmuştur (Pohland ve diğ., 1992) .

Hollanda Ulusal Toksikoloji Programı tarafından yürütülen bir çalışmada OTA'nın, dişi ve erkek F344/N sıçanları üzerinde kanserojenik aktivitesi doğrulanmıştır. Dişi sıçanların erkeklere göre daha dirençli olduğu gözlenmiştir. 2 yıl süre ile 210 mg/kg vücut ağırlığı OTA dozunda beslenen erkek farelerin %72'sinde, dişi farelerin %16'sında böbreklerde tümör oluştuğu belirlenmiştir. 70 mg/kg vücut ağırlığı OTA dozu verilen sıçanlarda tümör oluşum oranı erkeklerde %39, dişilerde %4 olarak bulunmuştur. Ayrıca dişi sıçanlarda meme bezlerinde ilerleyen türden fibroadenoma gözlenmiştir (Pohland ve diğ., 1992) .

Okratoksin A'nın böbrekleri etkilediği ve Bulgaristan, Romanya ve Yugoslavya'nın aralarında bulunduğu Balkan ülkelerinde insanlarda görülen böbrek tümörleri ile ilgisi olduğu bulunmuştur. Bu nedenle insanlarda OTA ile kontamine gıda tüketimi, Balkan Endemik Nefropati (BEN) sendromu ile ilişkilendirilmektedir. OTA'nın hayvanlarda muhtemel böbrek toksini olduğu belirlenmiştir. Danimarka, Bulgaristan, İskandinav Ülkeleri ve Polonya'da yapılan çalışmalar sonucunda domuzlarda nefropatiye sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalığa sahip insanların gösterdiği belirtiler, hayvanlarda gözlenen OTA toksisitesi ile aynıdır (Pohland ve diğ., 1992; DeVries ve diğ.,2002; Mantle, 2002) .

Bugüne kadar deney hayvanlarının OTA ile uzun dönemli beslenmesi yolu ile yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular sonucunda, OTA'nın en azından çalışılan hayvan türleri ve cinsleri üzerinde nefrotoksik ve kanserojenik etkisi kesinleşmiştir. (Pohland ve diğ., 1992; DeVries ve diğ., 2002). Ayrıca, teratojenik ve immunotoksik olduğu da bildirilmektedir. Nefrotoksik ve kanserojenik özellikleri risk analizleri ve güvenlik değerlendirmeleri açısından üzerinde önemle durulan konulardır. Bu bağlamda, OTA'nın etkisi türler ve cinsiyetler arasında değişiklikler göstermektedir. Sıçanlar farelere göre ve dişi sıçanlar erkeklerine göre daha hassastır. Nefropatik açıdan bakıldığında ise domuzların farelere göre çok daha hassas olduğu görülmektedir. Nefrotoksisite ve böbrek tümörleri açısından gözlenen en düşük etki seviyesi (LOEL) ve etki gözlenmeyen seviye (NOEL) Tablo 2.4'te verilmiştir (DeVries ve diğ., 2002).

Tablo 2.4: Okratoksin A'nın Nefrotoksisite/Kanserojenite LOEL ve NOEL Değerleri (DeVries ve diğ., 2002)

TÜRLER	ETKİ	ÇALIŞMA SÜRESİ	LOEL (µg/kg vücut ağırlığı/gün)	NOEL (µg/kg vücut ağırlığı/gün)
Fare (erkek)	Böbrek tümörleri	2 yıl	4,400	130
Sıçan (erkek)	Proksimal tubular hücrelerinde karyomegali	90 gün	15	-
	Böbrek tümörleri	2 yıl	70	21
Domuz	Böbrek fonksiyonları bozukluğu	90 gün	8	-
	Aşamalı nefropati	2 yıl	40	8

Bileşiklerin mutajenitesini ölçmek için geliştirilmiş çeşitli standart yöntemler kullanılarak yapılan araştırmalar sonucunda OTA mutajenitesi negatif olarak belirlenmiştir (Pohland ve diğ., 1992) .

Okratoksin A'nın genotoksik etkileri henüz netlik kazanmamıştır. Kısa süreli yapılan çalışmaların birçoğunda gen mutasyonları, programlanmamış DNA sentezi, kardeş kromatid değişimi ve kromozomal bozukluklar negatif veya belirsiz olarak bulunmuştur (DeVries ve diğ., 2002).

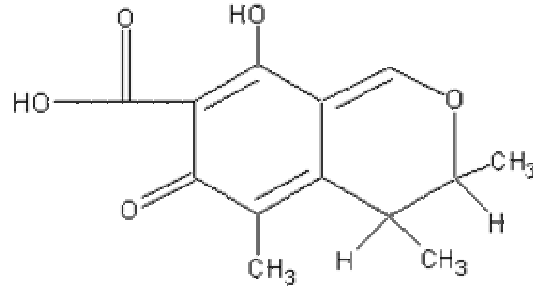
2.7 Sitrinin

Sitrinin, 1931 yılında doğal antibiyotik maddeler üzerine yapılan bir çalışmada *P. citrinum* kültüründen izole edilmiştir (Frank, 1992). *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri tarafından üretilen sekonder bir metabolit olup, gıdalara sıklıkla kontamine olmaktadır (Krejci ve diğ., 1996).

Sitrininin kimyasal yapısı Şekil 2.6'da görülmektedir. Molekül formülü $C_{13}H_{14}O_5$, molekül ağırlığı 250,25gr ve erime noktası 170-173°C'dir. Sarı renkli, kristal halde ve kokusuzdur (Frank, 1992). Seyreltik alkali (sodyum hidroksit, sodyum karbonat,

sodyum bikarbonat ve sodyum asetat ve polar organik solventler (etanol, dioxane, aseton, benzen ve kloroform) ile çözünmektedir (Frank, 1992; Miller ve Trenholm, 1994). %95 etanol ya da n-hegzan çözgeni içerisinde ısıya dayanıklıdır. Asit ve alkali solüsyonlarında stabil değildir (Fouler ve diğ., 1994).

Sitrinin muhtemel böbrek toksini olup, gıda ve yemlerde doğal kontaminant olarak bulunmaktadır (Kitabatake ve diğ., 1991; Triverdi ve diğ., 1992). Tüm türlerde yapılan testlerde, CIT'i böbrek işlevini bozduğu belirlenmiştir. Bu nedenle insanlarda Balkan Endemik Nefropati (BEN) ve Japonya'da sarı pirinç sendromuna neden olan bir ajan olarak ilişkilendirilmektedir (Comerio ve diğ., 1998).



Şekil 2.6: Sitrinin Kimyasal Yapısı (Anon., 2003)

2.7.1 Sitrinin Üreten Küfler ve İzole Edildiği Gıdalar

Sitrinin üreticisi küfler; *P. aurantiogriseum*, *P. canescens*, *P. chrysogenum*, *P. citreoviride*, *P. vitrinum*, *P. claviforme*, *P. expansum*, *P. fellutanum*, *P. hirsutum*, *P. implicatum*, *P. jensei*, *P. lividum*, *P. notatum*, *P. palitans*, *P. steckii*, *P. velutinum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* olarak belirtilmektedir (Hald ve Krogh, 1973; Frisvad, 1981; Frisvad ve Filtenborg., 1983; Miller ve Trenholm, 1994; Sweeney ve Dobson, 1998).

Sitrininin ayrıca *Aspergillus niveus* ve *A. terreus* tarafından da üretildiği bildirilmiştir (Hald ve Krogh, 1973). Sitrinin bazen diğer mikotoksinler ile birlikte üretilmektedir. *P. viridicatum* ve *P. verrucosum*'un CIT ve OTA ürettikleri bildirilmiştir (Frisvad, 1981; Miller ve Trenholm, 1994).

Buğday, arpa, çavdar, yulaf,mısır, soya fasulyesi, pirinç, küflenmiş ekmek, meyve, üzüm, elma, kuruyemiş, yağlı tohumlar ve yem tahıllarından izole edilmiştir (Hald ve Krogh, 1973; Frank, 1992; Pitt ve Hocking, 1997; Comerio ve diğ.,1998; Abrunhosa ve diğ., 2001; Martins ve diğ., 2002; Shu ve Lin, 2002).

Fermente ve kürlenmiş etler, jambon, sucuk ve peynirden izole edilmiştir (Pitt ve Hocking,1997).

2.7.2 Sitrinin'in Biyolojik Etkileri

Sitrinin, diğer toksinler gibi beslenme ile alınan doza bağlı olarak akut ya da kronik rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Kronik CIT toksikozisinde hedef organ böbrektir (Hald ve Krogh, 1973).

Sitrinin toksisitesinde en sık gözlenen durum, vücut ağırlığında kayıptır (Thacker ve diğ., 1977). Vücut ağırlığındaki azalmanın, su tüketimindeki artışa ve böbrekteki dejenerasyona bağlı olarak gerçekleştiği belirtilmektedir (Robinson, 2000). Tablo 2.5'te farklı türler için ağız yolu ile alınan LD₅₀ değeri, vücut ağırlığı üzerinden belirtilmiştir.

Tablo 2.5 Sitrininin LD₅₀ Değerleri (Frank, 1992; Trucknes ve Pohland, 2000)

Türler	LD₅₀ (mg/kg)
Sıçan	50
Fare	112
Hemstir	67
Gine domuz	43
Ördek	57
Tavuk	95
Tavşan	134

LD₅₀ değeri, hayvan türü, cinsiyet, çalışmayı yürütenin izlediği yol gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Pfohl-Leskowicz ve diğ., 2002).

Sitrininin hücresele düzeyde etkisi; mitokondride birikim, elektron taşıma sisteminde kesinti, DNA, RNA ve protein sentezinde inhibisyon olarak karakterize edilmektedir (Frank, 1992; Sabater-Vilar ve diğ., 1999).

Tüm türlerde yapılan testlerde, CIT'nin böbrek işlevlerini bozduğu belirlenmiştir, bu nedenle insanlarda Balkan Endemik Nefropati (BEN) ve Japonya'da sarı pirinç sendromundan (yellow rice) sorumlu tutulmaktadır (Krejci ve diğ., 1996; Comerio ve diğ., 1998; Sabater-Vilar ve diğ., 1999).

Ayrıca kan basıncında azalma, emesis ve diyare (elektrolit dengesinin bozulması)'ye neden olmaktadır (Krejci ve diğ., 1996).

Sitrinin, OTA ile birlikte sinerjistik etki göstermektedir. Okratosin A ve CIT'nin muhtemel hepatotoksik ajanlar olabileceği belirtilmektedir (Gupta ve diğ., 1984).

200 mg/kg dozunda CIT tüketildiğinde kanserojen etki gözlenmiştir (Frank, 1992; Pfohl-Leskowicz ve diğ., 2002). Okratoksin A verilen 20 fareden 6'sında, OTA ve CIT'nin birlikte uygulandığı 18 fareden 10'unda tümör oluşumu tespit edilmiştir. Bu nedenle CIT'nin OTA ile birlikte ilave toksik etki gösterdiği belirtilmektedir (Wijnanads ve Leusden, 2000).

Sitrinin'in mutajenitesi ve genotoksisitesi tartışmalı durumda olup, kısa dönemli mutajenite testi negatif olarak belirtilmiştir (Sabater-Vilar ve diğ., 1999; Shu ve Lin, 2002).

Vücut ağırlığı üzerinden 20-50 mg/kg arasında değişen dozlarda; fare, sıçan, gine domuzu, köpek ve tavşanlarda hasara neden olduğu belirtilmiştir (Frank, 1992).

Sitrinin'in OTA'dan daha az toksik olduğu bulunmuştur (Kitabatake ve diğ., 1993).

2.8 Okratoksin A ve Sitrinin Kombinasyonunun Etkileri

Doğal mikotoksikozis genellikle mikotoksin kombinasyonlarına maruz kalma sonucu ortaya çıkar. Gıdalarda mikotoksin kombinasyonlarına sıklıkla rastlanmakta ve farklı gıdaların birarada alınması kombinasyon yaratmaktadır. Farklı mikotoksinlerin veya mikotoksinler ve diğer toksik maddelerin bir arada bulunması sinerjistik veya antagonistik etki oluşturabilir (Ringot ve diğ., 2005).

Penicillium verrucosum'un OTA ve CIT birlikte üretme yeteneği sebebi ile, bu iki toksin arpa ve diğer birçok tahılda doğal kontaminant olarak bulunmaktadır (Pohland ve diğ., 1992).

Yapılan çalışmalarda OTA ve CIT'nin sıçan, fare, domuz ve kümes hayvanlarında nefrotoksisite açısından sinerjistik veya arttırıcı etki gösterdikleri belirlenmiştir (Pohland, 1992; Speijers ve Speijers, 2004). Okratoksin A ve CIT etkileşimleri Tablo 2.6'da verilmiştir.

Kransmüller ve diğ. (2004), insanlarda kanserli karaciğer hücreleri ile yaptıkları çalışmada CIT'in, küflü gıdalar ile alınan OTA gibi DNA reaktif kanserojenlerin etkisini açığa çıkardığını belirlemişlerdir.

Okratoksin A ve CIT'nin ikisine birlikte maruz kalma sonucunda kanser oluşum riskinin önemli ölçüde attığı bilinmektedir (Ringot ve diğ., 2005).

Tablo 2.6: Okratoksin A ve Sitrinin Etkileşimleri (Speijers ve Speijers, 2004)

TEST SİSTEMİ/ÖLÇÜM	ETKİ
Karaciğer hücreleri-RNA/DNA, protein sentezi	Sinerjistik
Böbrek kortikal hücreler-organik iyon taşınması	Arttırıcı ve hafif sinerjistik
Beyaz horoz-böbrek fonksiyonu	Antagonistik
Cıvciv-renal ultrastructure	Arttırıcı
Fare karaciğeri böbrek kanseri	Sinerjistik (sadece böbrek etkisi için)
Cıvciv embriyosu -oluşum bozukluğu	Arttırıcı
Piliç-büyüme depresyonu, su tüketiminde artış	Antagonistik
Sıçan (fetüs)-oluşumu bozukluğu	Sinerjistik
Sıçan-böbrek Na ⁺ -K ⁺ ve Mg ATPase	Sinerjistik (sadece Na ⁺ -K ⁺ ve Mg ATPase)
Fare-letal etki	Sinerjistik
Gine domuzu-letal etki	Sinerjistik (dişilerde), arttırıcı (erkeklerde)
Köpek-Nefrit	Sinerjistik belirti
Yavru domuz-böbrek üstü hücreleri PAH iyonları ve protein sentezi	Sinerjistik (protein sentezi için), arttırıcı (diğer etkiler için)

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Bu çalışmada çekirdeksiz, konserve edilmiş, 650 gr'lık cam kavanozlarda, farklı partilerden alınan yeşil ve siyah zeytinler kullanılmıştır.

Zeytinlerin aşılmasında kullanılan *Penicillium verrucosum* var *verrucosum* (CBS-223.71) Hollanda'daki Kültür Koleksiyonu Merkezi'nden (CBS) temin edilmiştir. Küf kültürleri analizler sırasında kullanılıncaya dek, saf kültür halinde yatık Malt Ekstrakt Agar'da (MEA-Merck-1.05398)'da +4⁰C'de saklanmıştır.

Penicillium verrucosum küfünü geliştirmek için kullanılan Patates Sukroz Agar (PSA) ve mikotoksin üretimini incelemek için kullanılan Czapeck Yeast Ekstrakt Agar (CYA), Malt Ekstrakt Agar (MEA) ve Yeast Ekstrakt Agar (YES) besiyerleri 3.2.1'de belirtilen içerikler karıştırılarak hazırlanmıştır.

Okratoksin A ve CIT, Sigma, C-1017 standartları olup kalitatif olarak belirlenmelerinde Merck firmasına ait 5721 silikajel G-60, 20x20 cm hazır plakalar kullanılmıştır.

Zeytin örneklerinden OTA'nın ekstrakte edilmesi amacı ile, OTA için spesifik antikolar içeren immunoafinite kolonları (OchraTestTM, Vicam) kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi otomatik katı faz ekstraksiyon cihazı (ASPEC XL, Gilson) ile yapılmıştır. Elde edilen ekstraktlarda OTA miktarının belirlenmesinde kullanılan HPLC (Agilent 1100 Series) sistemine, C18 kolon (Supelco) ve floresans dedektör (Agilent 1100 Series) bağlanmıştır.

3.2 Metot

Öncelikle, *P. verrucosum* küfü YES, CYA ve MEA besiyerlerine aşılansmış, 5°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C'de 14 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonların 7. ve 14. günlerinde besiyerlerinde ince tabaka kromatografisi

(TLC) yöntemi ile OTA ve CIT oluşumu incelenmiştir. Analizler 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında öncelikle, materyal olarak kullanılacak siyah ve yeşil zeytinler, mikroorganizma ve mikotoksin varlığı açısından test edilmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Siyah ve yeşil zeytinler, *P. verrucosum* ile 10^6 spor/ml olacak şekilde aşılanmıştır. 20°C ve 25°'de 30 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 7., 14., 18., 21. ve 30. günlerinde zeytinler analize alınarak HPLC yöntemi ile OTA ve TLC yöntemi ile CIT oluşumu incelenmiştir. Analizler 2 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 *Penicillium verrucosum*'un Besiyerlerine Aşılanması

Penicillium verrucosum küfünün OTA ve CIT üretimini incelemek için kullanılan besiyerlerinin bileşimi ve pH dereceleri (Pitt ve Hocking, 1997) aşağıda verilmiştir:

Malt Ekstrakt Agar (MEA)

Agar	20g
Glukoz	20g
Malt Ekstrakt	20g
Pepton	1g
Distile su	1lt
pH : 5.5	

Czapek Maya Ekstrakt Agar (CYA)

Di potasyum hidrojen fosfat	1g
Czapek Çözeltisi	10 ml
İz Metal Çözeltisi	1ml
Maya Ekstraktı (Toz)	5g
Sukroz	30g
Agar	15g
Distile su	1lt
pH : 6.7	

Czapek Çözeltisi

NaNO ₃	30g
KCl	5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
Distile su	100ml

İz Metal Çözeltisi

CuSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1g
Distile su	100ml

Maya Ekstrakt Agar (YES)

Maya Ekstraktı	20g
Sukroz	150g
Agar	20g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
Distile su	1 lt

pH : 7.2

Yukarıda belirtilen içerikler kullanılarak besiyeri karışımları hazırlanmıştır. Karışımlar, agar eriyene kadar su banyosunda tutulmuştur. Besiyeri pH değerleri belirtildiği şekilde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildikten sonra aseptik şartlarda petrilere dökülmüştür.

Steril iğne bir öze yardımı ile yatık MEA’da bulunan *P. verrucosum*’dan alınarak petri kaplarında katılaştıran besiyerlerinde 3 farklı noktaya batırmak suretiyle aşılama yapılmıştır.

Aşılama yapılan petri kapları ters çevrilerek 5°C, 15°C, 20°C, 25°C,30°C ve 35°C’ye ayarlanmış inkübatörlere yerleştirilmiş ve 14 gün süre ile inkübasyon uygulanmıştır.

3.2.2 Spor Süspansiyonunun Hazırlanması

+4°C'de muhafaza edilen *P. verrucosum* stok kültüründen yatık Patates Sukroz Agar'a (PSA) (Samson ve diğ., 2002) aşılınmış ve 25°C'de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir. Her bir tüpe 5 ml peptonlu su ilave edilerek steril bir öze ile agar yüzeyi kazınmış ve küf sporları sıvıya geçirilmiştir. Tüpler, tüp karıştırıcıda homojenize edildikten sonra aseptik koşullarda steril bir erlene aktarılmıştır. Elde edilen spor süspansiyonu tekrar homojenize edildikten sonra 0.1 ml çözelti, steril bir pipet kullanılarak Thoma lamına aktarılmıştır. Mikroskop altında x40 objektif kullanılarak küf sporları sayılmıştır (Gürkün ve Halkman, 1998). Bu şekilde hazırlanan küf süspansiyonu ile 10⁶ spor/ml olacak şekilde zeytinlere inoküle edilmiştir.

Patates Sukroz Agar (PSA) :

Patates	200g
Sukroz	20g
Agar	20g
Distile Su	1 lt

Kabukları soyulan patates dilimlenerek 200 ml distile suda haşlanır ve iyice ezilir. Kalan distile su, sukroz ve agar karıştırılarak, su banyosunda erimesi sağlanır. PH 5,4'e ayarlanır. Otoklavada 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Peptonlu Su (Oxoid-L37):

Pepton	10,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Di potayum hidrojen fosfat	9,0 g
Potasyum dihidrojen fosfat	1,5 g
Distile su	1 litre

Bileşimi verilen Oxoid firmasına ait besiyerinden 25 g tartılarak 1 lt distile su ile çözülmüştür.

3.2.3 Zeytinlerin Aşılması

Steril poşetler içersine 50'şer gram tartılan siyah ve yeşil zeytinlerin üzerine, hazırlanan spor süspansiyonundan 1ml alınarak, 10^6 spor/ml olacak şekilde, aseptik koşullarda ilave edilmiştir. Aşılana zeytinlere 10 ml saf su eklenmiştir. Zeytinler hafifçe çalkalanarak küfün zeytin üzerine homojen dağılımı sağlanmıştır. Zeytinler 20°C ve 25°C'de 30 gün süre ile inkübe edilmiştir

3.2.4 Besiyerlerinde Mikotoksin Analizleri

3 nokta ekim yöntemi ile *P. verrucosum* aşılana MEA, CYA ve YES besiyerlerinde ince tabaka kromatografisi yöntemi ile OTA ve CIT analizleri yapılmıştır. Besiyerinde gelişen kolonilerin merkezlerinden, 3 mm çapında misel tabakası pastör pipeti ile düzgünce kesilerek çıkarılmıştır. Kolonilerden alınan dairesel kesitler, silicagel G-60 tabakalar üzerine yerleştirildikten sonra, 1-2 damla kloroform-metanol (2:1) çözeltisi ile nemlendirilerek hafifçe bastırılmıştır. Daha sonra tabaka yürütücü çözeltinin bulunduğu tank içine yerleştirilmiştir. Yürütme işlemi karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Yürütme işleminde toluen-etil asetat-formik asit (5:4:1) kullanılmıştır (Pitt, 1987). Yürütme işlemi sonrasında plaka karanlıkta kurutulmuştur. Tabakada görülen spotlar, öncelikle doğrudan 366 nm UV ışığı altında, CIT standardının verdiği sarı renk ile karşılaştırma yapılmıştır. Daha sonra, tabaka 10-15 sn. amonyak buharına tutulmuş ve tekrar 366 nm UV ışığı altında OTA standardının verdiği mavi renk ile karşılaştırılmıştır (Lin ve diğ., 1998).

Dairesel koloni kesitleri tabakaların üzerine alttan 2 cm mesafe bırakılarak, 2 cm aralıklarla dizilmiştir.

3.2.5 Zeytinlerde Mikotoksin Analizleri

3.2.5.1 Zeytinlerde Okratoksin A Analizleri

Zeytin örneklerinde OTA analizi, Chan ve diğ.(2004) göre yapılmıştır. Uygulama, örnek hazırlama, otomatik katı faz ekstraksiyon cihazına bağlanan immunoafinite kolonları ile ekstraksiyon ve elüsyon, kurutma, HPLC sistemine enjekte etme ve değerlendirme şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Örnek hazırlama aşamasında, *P. verrucosum* sporları ile aşılansarak 20°C ve 25°C’de inkübe edilen yeşil ve siyah zeytinlerden 50 g tartılarak, 100 ml %5 tuz içeren metanol-su (80:20 v/v) karışımı ilave edilmiş ve yüksek hızda 1 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Hazırlanan homojen karışım kaba filtre kağıdından süzülerek temiz cam bir erlende toplanmıştır. Filtre edilmiş ekstraktların 10 ml’si 40 ml distile su eklenerek seyreltilmiş ve iyice karıştırılmıştır.

İmmunoafinite kolon kromatografisi ile ekstraksiyon işleminde, OTA için spesifik antikolar içeren immunoafinite kolonları (OchraTest™, Vicam) otomatik katı faz ekstraksiyon cihazına (ASPEC XL, Gilson) yerleştirilmiştir. Gilson 735 kontrol yazılımı ile immunoafinite kolon kromatografisi işlemi otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Seyreltilmiş ekstraktların 10 mL’si immunoafinite kolonuna verilmiş, 1-2 damla/sn. hızında kolondan geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra, bileşimi aşağıda belirtilen 10 ml 1 x Mikotoksin Yıkama Çözeltisi ve ardından 10 ml distile su 1-2 damla/sn akış hızında kolondan geçirilmiştir. Okratoksin A’nın immunoafinite kolonundan elue edilmesi için 1.5 mL HPLC derecesinde metanol kolona enjekte edilmiş ve 1 damla/sn hızında kolondan geçirilerek eluat cam bir tüpte toplanmıştır.

1 x Mikotoksin Yıkama Çözeltisi :

Sodyum klorür	25,0g
Sodyumbi karbonat	5,0g
Tween 20	0.1 ml

Bileşimi verilen içerik karıştırılarak 1 lt distile su içinde çözülmüştür.

Cam tüpte toplanan eluatlar, 30°C’de azot gazı altında tamamen kurutulmuştur. Kuru ekstraktlara 200 µl mobil faz içinde çözülerek, tüp karıştırıcı karıştırılmış ve HPLC sistemine (Agilent 1100 Series) enjekte edilmiştir.

Elde edilen ekstraktlarda OTA miktarının belirlenmesi için kullanılan HPLC yönteminde C18 kolon (Supelco), mobil faz olarak asetonitril-su-asetik asit (49.5:49.5:1 v/v/v) karışımı kullanılmıştır. Mobil fazın akış hızı 1 ml/dakika olarak ayarlanmıştır. Dedeksiyon için floresans dedektör (Agilent 1100) kullanılmıştır. Dedektör, OTA’nın tespit edilmesi için 333 nm eksitasyon ve 477 nm emisyon değerlerine programlanmıştır.

Okratoksin A tespit edilen örneklerde, OTA’nın doğrulanması Beatriz ve diğ. (2006)’ne göre yapılmıştır. Okratoksin A, metil ester oluşumu prensibine göre doğrulanmıştır. Örnek ve OTA standardından 200µl alınarak azot gazı altında tamamen kurutulmuştur. Kurutulan örnek ve standarda, bor tri fluorid-metanol kompleksinin metanol içinde hazırlanmış %20’lik çözeltisinden 300 µL eklenmiş su banyosunda 80°C’ye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Çözeltiler tekrar azot gazı altında tamamen kurutulduktan sonra 1ml mobil faz içinde çözülmüş ve HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Pozitif sonuçlar, kolonda tutulma zamanında gelmesi beklenen OTA pikinin kaybolması ve daha sonra yeni bir pikin (OTA metil ester piki) görülmesi ile doğrulanmıştır.

3.2.5.2 Zeytinlerde Sitrinin Analizleri

Zeytin örneklerinde CIT analizi Pitt (1987), Lin ve diğ. (1998) ve Korukoğlu ve diğ. (2000)’e göre yapılmış olup, uygulama; örnek hazırlama, yağ özütlemesi (yağsızlaştırma), arıtma, özütleme, susuzlaştırma, buharlaştırma, kurutma, ince tabakaya taşıma, geliştirme ve değerlendirme şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Örnek hazırlama aşamasında, *P. verrucosum* sporları ile aşılansak 20°C ve 25°C’de inkübe edilen yeşil ve siyah zeytinlerden 25 g tartılarak, 120 ml %4 tuz içeren metanol-su (6:4) karışımı ilave edilmiş ve blendırda 2 dakika yüksek hızda homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş karışım Whatman No.4 filtre kağıdından süzölmüştür.

Sitrinin zeytinlerden özütlenmesi için, hazırlanan örnekler 250 ml'lik ayırma hunisine alınarak, 2 kez 50 ml hegzan ile 5 dakika süre ile çalkalanıp üst hegzan fazı ayrı bir kaba alınmış ve bu faz 25 ml metanol-su karışımı ile yıkanıp, alt metanol-su fazı alınmış ve yağı giderilmiş metanol-su özütüne ilave edilmiştir.

Metanol-su karışımı özütüne 8 ml %20'lik kurşun asetat çözeltisi ilave edilerek 3 saat çöktürme işlemi yapılmıştır.

Whatman No.4 filtre kağıdından 250 ml'lik ayırma hunisine süzülen, arıtılmış metanol-su özütü üzerine 45 ml distile su verildikten sonra üç kez arka arkaya ve her defasında 5 dk çalkalayarak 10 ml kloroform ile özütleme uygulanmıştır. Daha sonra kloroform fazı, susuz Na₂SO₄ üzerinden süzülerek sudan arındırılmıştır. Elde edilen susuz kloroform özütü vakum altında 50°C'de yaklaşık 2 ml'ye kadar buharlaştırılmış, daha sonra azot gazı verilerek tamamen kurutulmuştur.

Kuru özütler 0.5 ml HPLC derecesinde kloroformda çözüldükten sonra 10 µl'lik mikropipetlerle silicagel G-60 tabaka üzerine 40'ar µl spotlanarak karanlık ortamda geliştirmeye alınmıştır. Geliştirme çözeltisi olarak toluen-etil asetat-formik asit (5:4:1) kullanılmıştır. tabakada görülen spotlar, 366 nm UV ışığı altında, CIT standardının verdiği sarı renk ile karşılaştırılmıştır. Miktar tayini yapılırken örnek ve standart spotlarının aynı Rf değerine sahip olmalarına dikkat edilmiştir. Plakaların üzerine spotlama işlemi, alttan 2 cm boşuk bırakılarak, 2 cm aralıklarla yapılmıştır.

3.2.5.3 Sitrinin Miktarının Hesaplanması

Örneklere CIT miktarının hesaplanması amacı ile aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Sitrinin (CIT) } \mu\text{g/kg (ppb)} = (\text{S} \times \text{Y} \times \text{V}) / (\text{W} \times \text{Z})$$

S: Plakada örnekle eşit floresans veren CIT standardının miktarı (µl)

Y: CIT standardının konsantrasyonu (µg/ml)

V: Kuru ekstraktı çözmek için kullanılan çözücü miktarı (µl)

W: Son ekstraktta bulunan örnek miktarı (g)

Z: Plakada CIT standardına eşit floresans veren örnek miktarı (µl)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Besiyerlerinde Mikotoksin Analizleri

14. gün sonunda 5°C, 30°C ve 35°C'de inkübe edilen besiyerlerinde *P. verrucosum*'un gelişmediği görülmüştür. 15°C, 20°C ve 25°C'de inkübe edilen besiyerlerinde ise *P. verrucosum*'un geliştiği ve CIT ürettiği tespit edilirken, yalnız 25°C'de OTA'ya rastlanmıştır. Literatürde *Penicillium verrucosum*'un gelişimi için en uygun sıcaklık aralığının 20°C - 25°C olduğu ve küfün gelişim hızına bağlı olarak OTA üretim miktarının arttığı, 25°C'de maksimuma ulaştığı belirtilmiştir (Aroyyo ve diğ., 2005, DeVeries ve diğ., 2002, Olsen ve diğ., 2003 Pardo ve diğ., 2005). Bulguların literatür verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

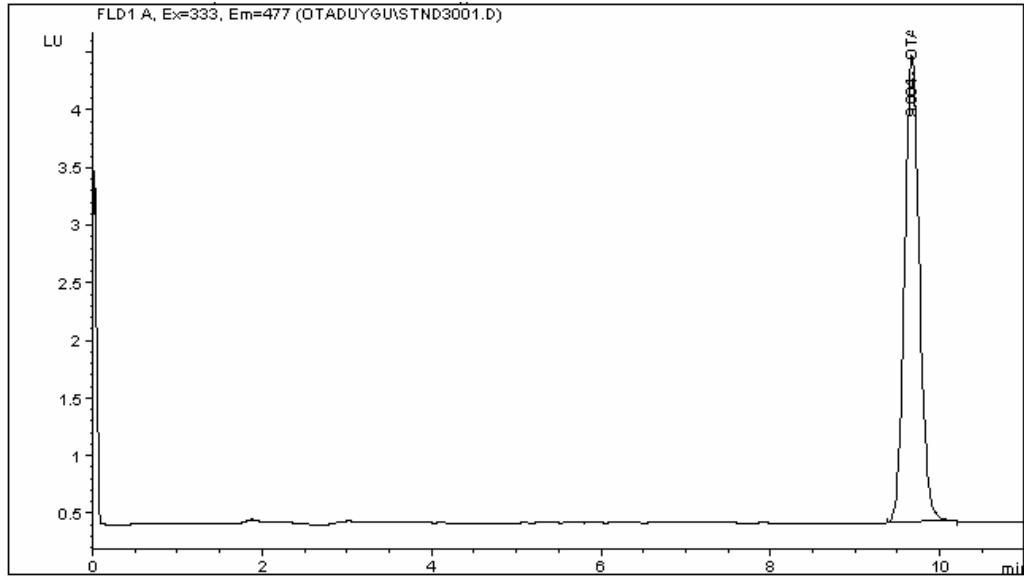
Tablo 4.1 14. Gün Sonunda Besiyerlerinde *P. verrucosum* Gelişimi ve Okratoksin A ve Sitrinin Oluşumu

<i>Besiyeri</i>	<i>İnkübasyon Sıcaklıkları, °C</i>					
	5	15	20	25	30	35
<i>MEA</i>						
Küf Gelişimi	-	+	+	+	-	-
OTA	-	-	-	+	-	-
CIT	-	+	+	+	-	-
<i>CYA</i>						
Küf Gelişimi	-	+	+	+	-	-
OTA	-	-	-	+	-	-
CIT	-	+	+	+	-	-
<i>YES</i>						
Küf Gelişimi	-	+	+	+	-	-
OTA	-	-	-	+	-	-
CIT	-	+	+	+	-	-

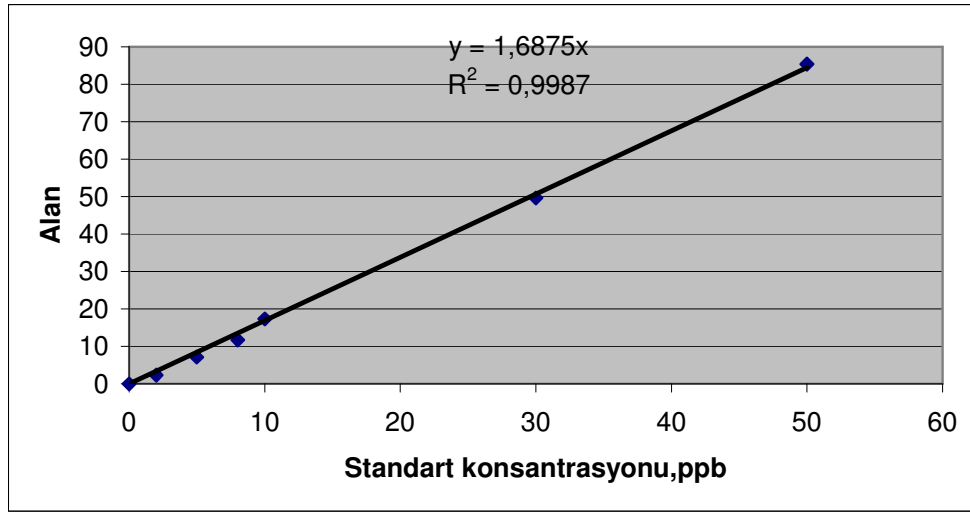
4.2 Zeytinlerde Yapılan Mikotoksin Analizleri

4.2.1 Zeytinlerde Yapılan Okratoksin A Analizleri

Okratoksin A standardına ait HPLC kromatogramı Şekil 4.1 de görülmektedir. HPLC ile zeytinlerde yapılan OTA analizi için kalibrasyon grafiği Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Okratoksin A Standardının HPLC Kromatogramı



Şekil 4.2 HPLC ile Okratoksin A Analizi için Kalibrasyon Grafiği

Zeytinler *P. verrucosum* küfö ile aşılandıktan sonra 20°C ve 25°C sıcaklık değerlerinde 30 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 7., 14., 18., 21. ve 30. günlerde siyah ve yeşil zeytinlerde HPLC ile OTA oluşumu incelenmiştir. Okratoksin A oluşumuna ait bulgular Tablo 4.2’de verilmiştir.

Siyah ve yeşil zeytinlerde 20°C’de ve 25°C’de OTA oluşumu belirlenmiştir. *Penicillium verrucosum*’un çeşitli gıdalarda, farklı koşullarda OTA üretiminin

incelendiği çalışmalarda, OTA miktarının 25°C’de en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (Aroyyo ve diğ., 2005, DeVeries ve diğ.,2002, Kokkonen ve diğ., 2005, Olsen ve diğ., 2003, Pardo ve diğ., 2005). Bulguların bu alanda yapılan diğer çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Zeytin örneklerinde HPLC ile yapılan OTA analizlerine ait kromatogramlar Ek.A’da verilmiştir.

Tablo 4.2 *Penicillium verucosum* Aşıl原因an Zeytinlerde Farklı Sıcaklık Derecelerinde Okratoksin A Oluşumu (ppb)

İnkübasyon Süresi (gün)	Okratoksin A Miktarı (ppb)*			
	Siyah Zeytin		Yeşil Zeytin	
	20°C	25°C	20°C	25°C
7	29,45	15,62	27,74	12,01
14	10,25	8,59	9,67	14,96
18	22,55	12,38	17,56	-
21	48,60	50,99	36,90	33,26
30	37,96	37,50	23,02	33,34

* : İki tekrarın ortalaması

Çalışmada kullanılan metot ile OTA’nın geri kazanımı oranının belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda OTA zeytin örneklerine eklenmiştir. Bu zeytin örneklerinde iki tekrarlı yapılan analizlerde ortalama OTA miktarları ve geri kazanım değerleri Tablo 4.3’te gösterilmiştir. Okratoksin A için ortalama geri kazanım değeri %69.11 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.3 Okratoksin A’nın Farklı Konsantrasyonlarda Geri Kazanım Değerleri

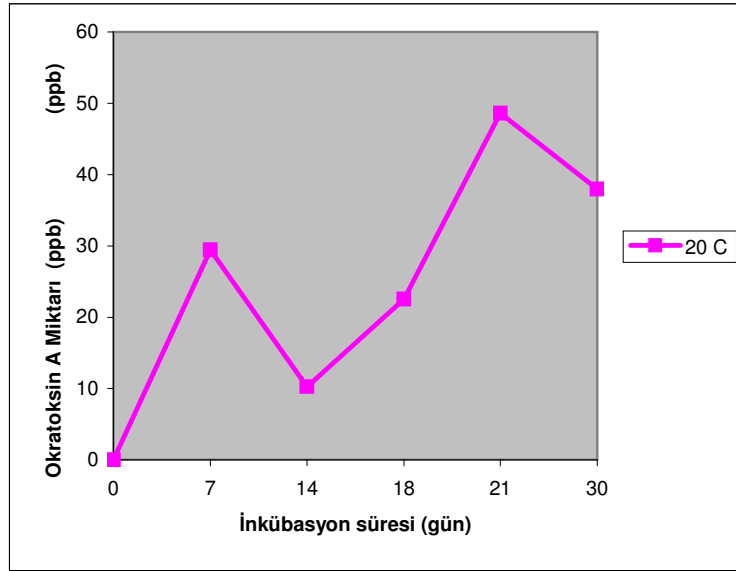
Eklenen Okratoksin A Konsantrasyonu (ppb)	Geri Kazanılan Okratoksin A Konsantrasyonu (ppb)*	Geri Kazanılan Okratoksin A Oranı (%)
2	1,42	71
5	3,37	67,4
10	6,97	69,7
20	13,45	67,25
50	35,01	70,2

Ortalama Geri Kazanım Oranı (%)	69,11
---------------------------------	-------

* : İki tekrarı ortalaması

Okratoksin A tespit edilen örneklerde, Beatriz ve diğ. (2006)'ne göre HPLC ile yapılan doğrulama çalışması sonucunda 9,6. dakikada gelmesi gereken OTA pikinin kaybolması ve 22. dakikada yeni bir pikin (OTA metil ester piki) belirmesi ile OTA doğrulanmıştır. Bu çalışmaya ait kromatogram Ek.B'de sunulmuştur.

20°C'de inkübe edilen siyah zeytinlerde OTA oluşumu Şekil 4.3'te görülmektedir. 20°C'de inkübe edilen siyah zeytinlerde OTA oluşumunun 7. günde 29,45 ppb olduğu, 14. günde azalarak 10,25 ppb değerine düştüğü belirlenmiştir. Okratoksin A miktarının, inkübasyonun 14. gününden itibaren artarak 21. günde 48,60 ppb değerine ulaştığı ve 30.günde tekrar azalarak 37,96 ppb değerine düştüğü tespit edilmiştir.



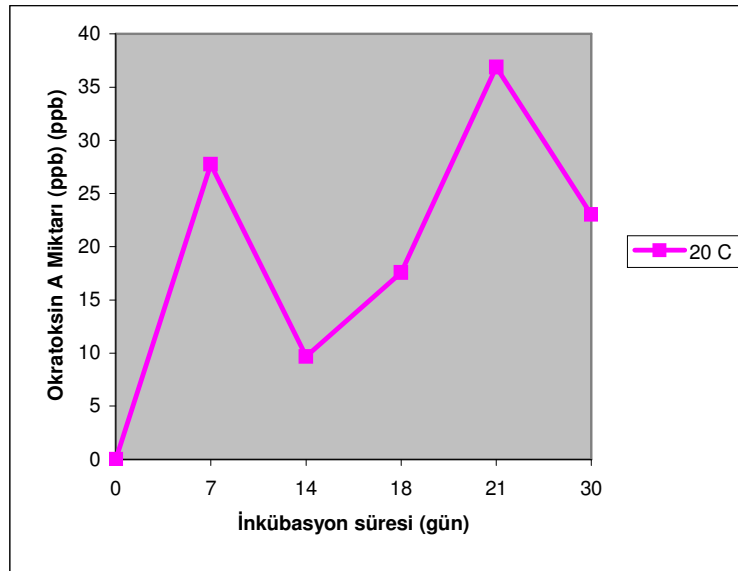
Şekil 4.3 Siyah Zeytinde 20°C'de Okratoksin A Oluşumu

25°C'de inkübe edilen siyah zeytinlerde OTA oluşumu Şekil 4.4'te görülmektedir. 25°C'de inkübe edilen siyah zeytinlerde OTA oluşumunun 7. günde 15,62 ppb olduğu, 14. günde azalarak 8,59 ppb değerine düştüğü belirlenmiştir. Okratoksin A miktarının, inkübasyonun 14. gününden itibaren artarak 21. günde 50,99 ppb değerine ulaştığı ve 30.günde tekrar azalarak 37,50 ppb değerine düştüğü tespit edilmiştir.



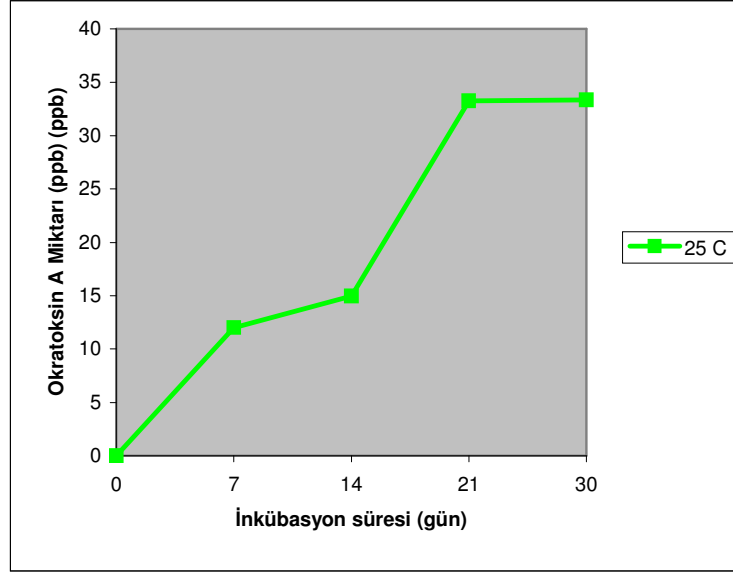
Şekil 4.4 Siyah Zeytinde 25°C'de Okratoksin A Oluşumu

20°C'de inkübe edilen yeşil zeytinlerde OTA oluşumu Şekil 4.5'te görülmektedir. 20°C'de inkübe edilen yeşil zeytinlerde OTA oluşumunun 7. günde 27,74 ppb olduğu, 14. günde azalarak 9,67 ppb değerine düştüğü belirlenmiştir. Okratoksin A miktarının, inkübasyonun 14. gününden itibaren tekrar artarak 21. günde 36,90 ppb değerine ulaştığı ve 30.günde tekrar azalarak 23,02 ppb değerine düştüğü tespit edilmiştir. 25°C'de inkübe edilen yeşil zeytinlerde OTA oluşumu Şekil 4.6'da görülmektedir.



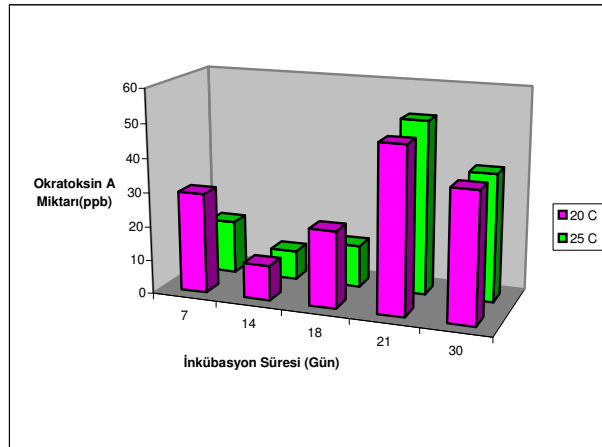
Şekil 4.5 Yeşil Zeytinde 20°C'de Okratoksin A Oluşumu

25°C’de inkübe edilen yeşil zeytinlerde OTA oluşumunun 7. günde 12,01 ppb, 14. günde 14, 96 ppb, 21. günde 33,26 ppb olduğu ve 30.güne kadar artarak 33,34 ppb değerine ulaştığı tespit edilmiştir.

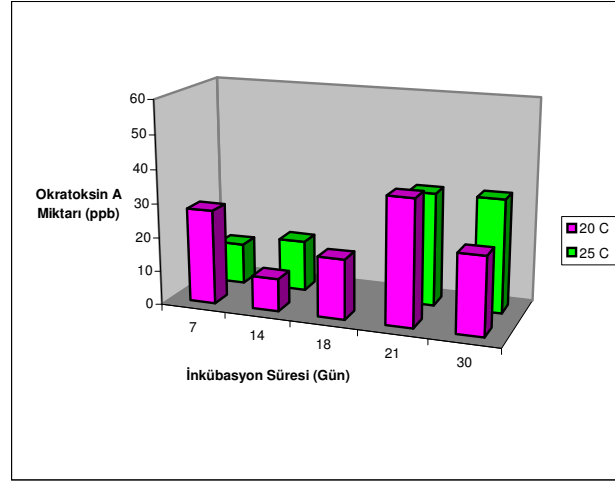


Şekil 4.6 Yeşil Zeytinde 25°C’de Okratoksin A Oluşumu

Zeytinlerde farklı sıcaklıklarda 30 gün inkübasyon süresince oluşan OTA miktarlarının karşılaştırıldığı Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 incelendiğinde, 20°C ve 25°C’de elde edilen değerlerin farklı olmadığı görülmektedir. Yapılan tek yönlü varyans analizleri sonucunda, $P \leq 0.05$ olasılık düzeyinde siyah ve yeşil zeytinlerde OTA oluşumu açısından sıcaklıklar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir (Ek C Tablo C.1 ve Tablo C.2).

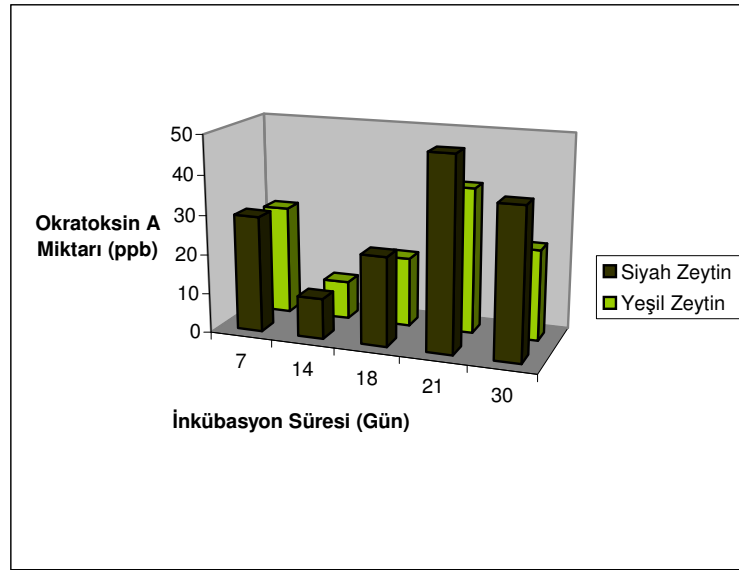


Şekil 4.7 Siyah Zeytinde Farklı Sıcaklıklarda Okratoksin A Oluşumu

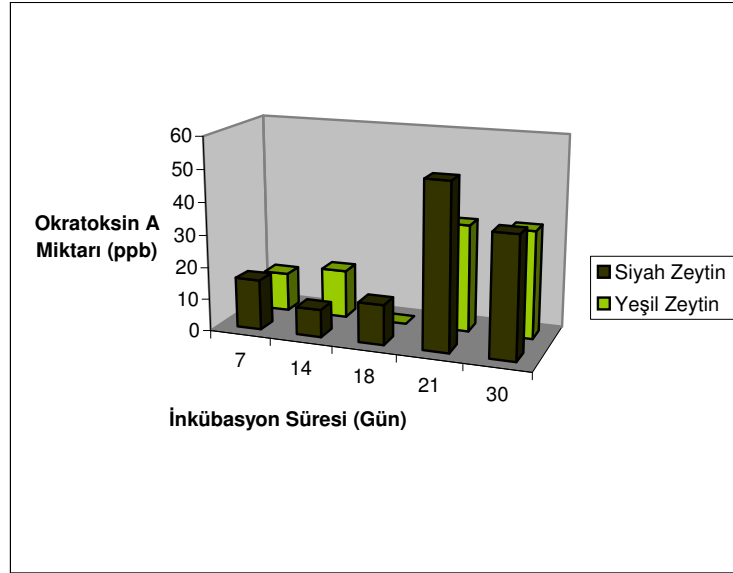


Şekil 4.8 Yeşil Zeytinde Farklı Sıcaklıklarda Okratoksin A Oluşumu

Siyah ve yeşil zeytinlerde aynı sıcaklık derecelerinde OTA oluşumunu gösteren Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 incelendiğinde, elde edilen verilerin benzer olduğu görülmektedir. Yapılan tek yönlü varyans analizleri sonucunda aynı sıcaklık derecesinde OTA oluşumu açısından, siyah ve yeşil zeytinler arasındaki farkın da $P \leq 0.05$ olasılık düzeyinde önemsiz olduğu görülmüştür (Ek C Tablo C.3 ve Tablo C.4)



Şekil 4.9 Siyah ve Yeşil Zeytinde 20°C'de Okratoksin A Oluşumu



Şekil 4.10 Siyah ve Yeşil Zeytinde 25°C’de Okratoksin A Oluşumu

4.2.2 Zeytinlerde Yapılan Sitrinin Analizleri

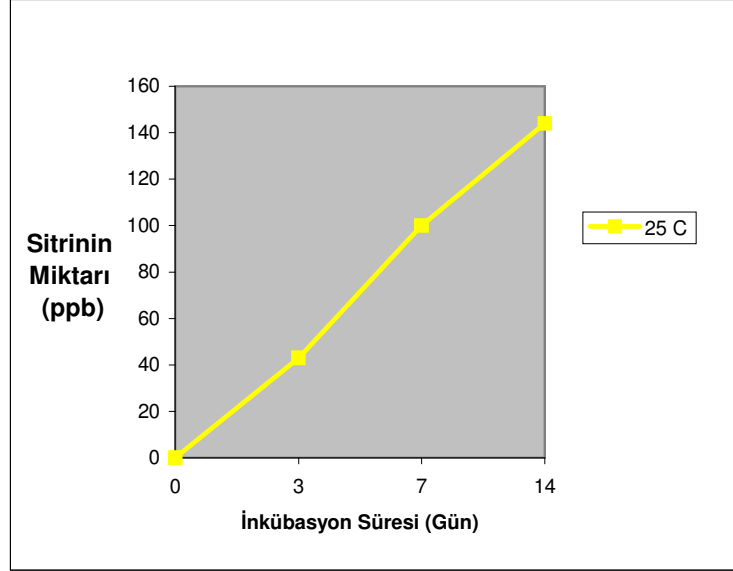
Zeytinler *P. verrucosum* küfü ile aşılandıktan sonra 20°C ve 25°C sıcaklık değerlerinde 30 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 3., 7. ve 14.günlerde siyah ve yeşil zeytinlerde TLC ile CIT oluşumu incelenmiştir. Sitrinin oluşumuna ait bulgular Tablo 4.4’te verilmiştir.

Tablo 4.4 *Penicillium verucosum* Aşılanan Zeytinlerde Farklı Sıcaklık Derecelerinde Sitrinin Oluşumu

İnkübasyon Süresi (gün)	Sitrinin Miktarı (ppb)*			
	Siyah Zeytin		Yeşil Zeytin	
	20°C	25°C	20°C	25°C
3	0	0	0	43
7	0	0	0	100
14	0	0	0	144

3., 7. ve 14. günlerde TLC ile yapılan CIT analizleri sonucunda, 20°C ve 25°C’de inkübe edilen siyah zeytinlerde ve 20°C’de inkübe edilen yeşil zeytinlerde CIT oluşmadığı belirlenmiştir. 25°C’de inkübe edilen yeşil zeytinlerde CIT oluştuğu ve zamana bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bulgular, Şişmanoğlu ve Heperkan (2003)’in yaptığı çalışma sonuçları ile uyumludur.

Yeşil zeytinlerde 25°C’de CIT oluşumu Şekil 4.11’de görülmektedir. 25°C’de inkübe edilen yeşil zeytinlerde CIT oluşumunun 3. günde 43 ppb, 7. günde 100 ppb olduğu ve 14.güne kadar artarak 143 ppb değerine ulaştığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.11 Yeşil Zeytinde 25°C’de Sitrinin Oluşumu

5. SONUÇ

Penicillium verrucosum ile aşıl原因anan siyah ve yeşil zeytinlerin 20°C ve 25°C'de inkübasyonu süresince, belirli aralıklarla HPLC ile yapılan OTA analizleri sonucunda OTA miktarının 21. günde en yüksek değerde olduğu bulunmuştur. *Penicillium verrucosum*'un siyah ve yeşil zeytinde gelişimi için en uygun sıcaklık aralığının 20°C - 25°C olduğu ve küfün gelişim hızına bağlı olarak OTA üretim miktarının arttığı, 25°C'de maksimuma ulaştığı belirlenmiştir.

3., 7, ve 14. günlerde TLC ile yapılan CIT analizleri sonucunda, 20°C ve 25°C'de inkübe edilen siyah zeytinlerde ve 20°C'de inkübe edilen yeşil zeytinlerde CIT oluşmadığı belirlenmiştir. Sitrinin oluşumu gözlenmeyen zeytinlerde, yüksek miktarlarda tespit edilen OTA'nın CIT oluşumuna engel olduğu veya oluşan CIT'nin parçalandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, CIT oluşmaması zeytinde bulunan fenolik bileşiklerden de kaynaklanabilir. 25°C'de inkübe edilen yeşil zeytinlerde ise CIT oluştuğu ve zamana bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Zeytinde küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunun önlenmesi için üretim sırasında sıcaklık ve tuz konsantrasyonu gibi 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

Abrunhosa, L., Paterson, R.R.M., Kozakiewicz, Z., Lima, N. and Venancio, A., 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes, *Letters in Applied Microbiology*, **32** (4), pp.240-242.

Anonymous, 2005a. http://www.gap-dogu-kalkinma.com/agaclandirma/122_zeytin.htm

Anonymous, 2005b. http://www.inetours.com/ImagesWT/single/Olive_tree.jpg

Anonymous, 2005c. <http://www.istrianaet.org/istria/flora/images/olive-tree.jpg>

Anonymous, 2005d. http://www.itb.org.tr/word_docs/rekolte_zeytin.doc

Anonymous, 2004a. <http://www.fao.org>

Anonymous, 2004b. <http://www.internationaloliveoil.org/economics3.asp>

Anonymous,2003.http://www.aspergillus.man.ac.uk/secure/mycotoxin/mycotoxin.php?pageNum_RsJournal=0&toxin=Citrinin

Anonymous,2000a.<http://www.agri.ankara.edu.tr/bahce/pratikbilgiler/meyve/zeytin/genel.htm>

Anonymous, 2000b. <http://www.zae.gov.tr>

Anonymous, 1991. Substance profiles: Ochratoxin A. US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program, Sixth Annual Report on Carcinogens, 1991.

Arıcı, M., 2001. Isolation and determination of mould fungi of figs, peanuts and olives from Turkey and screening of these for mycotoxins, *Ernaehrung*, **25**, 4, 157-160 in Food Science & Technology Abstracts.

Arora, D.K., 1991. Handbook of Applied Microbiology, M. Dekker, New York.

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**(3), pp. 223-231 .

Bata, A. and Lásztity, R.,1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, **10**(6-7), pp. 223-228

Benford, D., Boyle, C., Dekant, W., Fuchs, R., Gaylor, D.W., Hard, G., McGregor, D.B., Pitt, J.I., Plestina, R., Shephard, G., Solfrizzo, M., Verger, P.J.P., Walker, R., 2001. *Ochratoxin A*, JECFA Evaluation , **47**.

- Beatriz, T.I., Taniwaki, M.H., Vincente, E., Menezes, H.C.,** 2006. Fungi Producing Ochratoxin in Dried Fruits, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **571** (181-8).
- Campaniello, D., Bevilacqua, A., D'Amato, D., Corbo, M.R., Altieri, C., Sinigaglia, M.,** 2005. Microbial Characterization of Table Olives Processed According to Spanish and Natural Styles, *Food Technology and Biotechnology*, **43** (3), pp.289-294.
- Chan, D., McDonald, S.J., Boughtflower, V., Brereton, P.,** 2004. *Simultaneous Determination of Aflatoxins and Ochratoxin A in Food Using a Fully Automated Immunoaffinity Column Clean-Up and Liquid Chromatography-Fluorescence Detection*, *Journal of chromatography A*, **1059**, pp.13-16.
- Chelkowski, J.,** 1991. Cereal Grain Mycotoxins , Fungi And Quality in Drying And Storage, *Development in Food Science* 26, Elsevier.
- Comerio, R., Pinto, V.E.F. and Vaanmonde, G.,** 1998. Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat, *International Journal of Food Microbiology*, **42**, pp. 219-223.
- DeVries, J. W., Truckness, M.W., Jackson, L. S.,** 2002. *Mycotoxins and Food Safety*, Kluwer Academic, Washington D.C.
- EC 123/2005,** 2005. EC Regulation on ochratoxin A, *Official Journal of The European Union*.
- Eltem, R., Öner, M.,** 1995. Salamura Tipi Sofralık Siyah Zeytinlerin Küf Florasının İncelenmesi. *Tr. J. of Biology*, **19**, 11-17, TUBITAK.
- Fernandez, G.A., Diez, F.M.J. and Adans, M.R.,** 1997. *Table Olives Production and Processing*, Chapman & Hall, London.
- Fouler, S.G., Triverdi, A.B. and Kitabatake, N.,** 1994. Detoxification of Citrinin and Ochratoxin A by Hydrogen Peroxide, *Journal of AOAC International*, **77** (3), pp. 631-636.
- Frank, H.K.,** 1992. Citrinin, *Z. Ernährungswiss*, **31**, pp.164-177.
- Frisvad, J.C, And Filtenborg O.,** 1983. Classification of Terverticillate *Penicillia* Based on Profiles of Mycotoxins and Other Secondary Metabolites, *Applied And Enviromental Microbiology*, **41**, pp.568-579.
- Frisvad, J.C.,** 1981. Physiological Criteria and Mycotoxin Production as Aids in Identification of Common Assymmetric *Penicillia*, *Applied And Enviromental Microbiology*, **41**, pp.568-579.
- Gourama, H. and Bullerman, L. B.,** 1998. Mycotoxin production by molds isolated from 'Greek-style' black olives. *International Journal of Food Microbiology*,

6(1), pp. 81-90 .

- Göçmen, D., Korukoğlu, M., Uylaşer, V., Gürbüz, O., Yıldırım, A., Şahin, i.,** 2000. Salamura Zeytinlerde Bozulma Etkeni Küfler, *Türkiye I. Zeytincilik Sempozyumu*, 6-9 Haziran, Bursa, pp.467-472.
- Gupta, M., Sasmal, D., Gupta, S.D. and Bagchi, G.K.,** 1984. Hepatotoxic Effects of Ochratoxin A and Citrinin in Mice, *Int. J. Pharmac.*, **16**, pp.238-240.
- Gürğün, V. Ve Halkman, A.K.,** 1988. Mikrobiyolojide Sayım yöntemleri, *Gıda Teknolojisi Derneği*, **7**, pp.46-49.
- Hald, B. and Krogh, P.,** 1973. Analysis and Chemical Confirmation of Citrinin in Barley, *Journal of the AOAC*, **56**(6), pp.1440-1443.
- Hussein, H.S. and Brasel, J.M.,** 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, **167**(2), pp.101-134 .
- Kailis, S.G., Harris, D.,** 2004. Establish Protocols And Guideliness For Table Olive Processing in Australia, *A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation*, RIRDC Publication No.04/136, RIRDC Project No.UWA 59A.
- Karadeniz, F. ve Ekşi, A.,** 2002. Gıdalarda Mikotoksin Oluşumunun Azaltılması, *Gıda*, **7**, pp.104-110.
- Kaşka, N., Güteryüz, M., Kaplankıran, M., Kafkas, S., Ercişli, S., Eşitken, A., Aslataş, R., Akçay, E.,** 2005. Türkiye Meyveciliğinde Üretim Hedefleri, *VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi*, 3-7 Ocak, Ankara.
- Kıvanç, M. ve Akgül. A.,** 1990. Mould growth on black table olives and prevention by sorbic acid methyl eugenol acid and spice essential oil, *Die Nahrung*, **34**(4), pp.369-373.
- Kitabatake N., Triverdi, A.B. and Doi, E.,** 1991. Thermal Decomposition and Detoxification of Citrinin Under Various Moisture Conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**(12), pp.2240-2244.
- Kitabatake, N., Doi, E. and Trivedi, A.B.,** 1993. Toxicity evaluation of the mycotoxins, citrinin and ochratoxin a, using several animal cell lines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **105**(3), pp. 429-433
- Kokkonen, M., Jetoi, M., Rizzo, A.,** 2005. The Effect Of Substrate On Mycotoxin Production Of Selected Penicillium Strains, *Int. Journal of Food Microbiology*, **99**, pp.207-214.
- Korukoğlu, M., Gürbüz, O., Uylaşer, V., Yıldırım, A. ve Şahin, İ.,** 2000. Gemlik Tipi Zeytinlerde Mikotoksin Kirliliğinin Araştırılması, *Türkiye I. Zeytincilik Sempozyumu*, 6-9 Haziran, Bursa, pp. 214-219.

- Kransmüller, S., Cavin, C., Chackraborty, F., Darroudi, F., Majer, B.J., Huber, W.W., Ehrlich, V.A.,** 2004. Structurally Related Mycotoxins Ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human derived liver (HepG2) cells: implication for Risk Assessment, *Nutr. Cancer*, **50**, pp.190-197.
- Krejci, M.E., Bretz, N.S. and Koechel, D.A.,** 1996. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anestheized dogs without concomitant reductions in potassium plasma, *Toxicology*, **106**, pp.167-177.
- Lin, Y.C., Ayres, J.C., Koehler, P.E.,** 1981. Effect of Temperature Cycling on the Production of Patulin and citrinin, *Journal of Food Science*, **46**, pp. 974-975.
- Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. and Golud, G.W.,** 2000. The Microbiological Safety and Quality of Food 1, Aspen Publishers, Gaithersburg, pp.696-701.
- Mantle, P.G.,** 2002. Risk Assesment and the Importance of Ochratoxins, *Int. Biodeterioration & Biodegradation*, **50**, pp.143-146.
- Martins, M.L., Gimeno, A., Martins, H.M. and Bernardo, F.,** 2002. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots, *Food Additives and Contaminants*, **19** (6), pp.568-574.
- 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.
- Miller, J. D. and Trenholm, H.L.,** 1994. Compounds other than Aflatoxin, Eagan Press, St. Paul, MN, USA, pp. 263-265.
- Olsen, M., Nils, J., Naresh, M., Banks, J., Corrado, F.,** 2003. Prevention of OTA in Cereals OTA Prev, *Quality of Life and Management of Living Resources*, Project No. QLK1-CT-1999-00433.
- Oral, J. ve Heperkan, D.,** 1999. *Lactobacillus plantarum*'un *Penicilium* mikotoksinlerine etkisinin zeytinde incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Orme, S. and Kegley, S.,** 2004. PAN Pesticide Database, *Pesticide Action Network*, North America, San Francisco, CA..
- Özkalp, B., Durak, Y.,** 1998. Konya ve Civarı Küflü Peynirlerinde Küf Florasının Araştırılması, *Doğa Türk Biyol. Derg.* , **3** , (22), pp.341-346.
- Pfohl-Leskowicz, 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*, **19** (3), pp.282-302.

- Pitt, J.**, 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and Production of Ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**(2), pp.266-269.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.O.**, 1997. *Fungi and Spoilage*, 2th Ed., Academic Press, Sdney, pp. 252-255.
- Pohland, A.E., Nesheim, S. and Friedman, L.**, 1992. Ochratoxin A: A Review, *Pure & Appl. Chem.*, **64** (7), pp.1029-1046.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.J. and Larondelle, Y.**, 2005. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, *In Press, Corrected Proof*.
- Robinson, R.K.**, 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, UK.
- Sabater-Vilar, M., Maas, R.R.M. and Fink-Gremmels, J.**, 1999. Mutagenity of Commercial *Monascus* Fermentation Products and the Role of Citrinin Contamination, *Mutation Research*, **444**, pp. 7-16.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O.**, 1996. Introduction to Food- Borne Fungi, 5th Ed., Centraalbureau Voor Schimmelcultures, The Netherlands, pp. 140-141.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O.**, 2002. Introduction to Food- and Airborne Fungi, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, The Netherlands.
- Shu, P.Y. and Lin, C.H.**, 2002. Simple and Sensitive Determination of *Citrinin*, *Monascus* by GC-Selected Ion Monitoring Mass Spectrometry, *Analytical Sciences*, **18**, pp.283-287.
- Sinha, K.K., Bhatnagar D., Dekker**, 1998. Detoxification of Mycotoxins and Food Safety in : *Mycotoxins In Agriculture and Food Safety*, Marcel Dekker, New York, pp.381-405.
- Speijers, G. J. A. and Speijers, M. H. M.**, 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, **153**(1), pp.91-98 .
- Sweeney, M. and Dobson, A.D.W.**, 1998. Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species, *International Journal of Food Microbiology*, **43**, pp.141-158.
- Şahin, İ., Kılıç, O., Başoğlu F., Korukoğlu, M. ve Göçmen, D.**, 1999. Salamura Siyah Zeytinlerde Rastlanan Küfler ve mikotoksin Riskleri, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, **22**, 2, pp.1-8.
- Şahin, İ., Kılıç, O., Başoğlu F., Korukoğlu, M. ve Uylaşer, V.**, 1996. Siyah zeytin florasında oluşan zarda (kefeke) küf florasının araştırılması, TC Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu, İşletme Müdürlüğü, Proje No: 93/94.

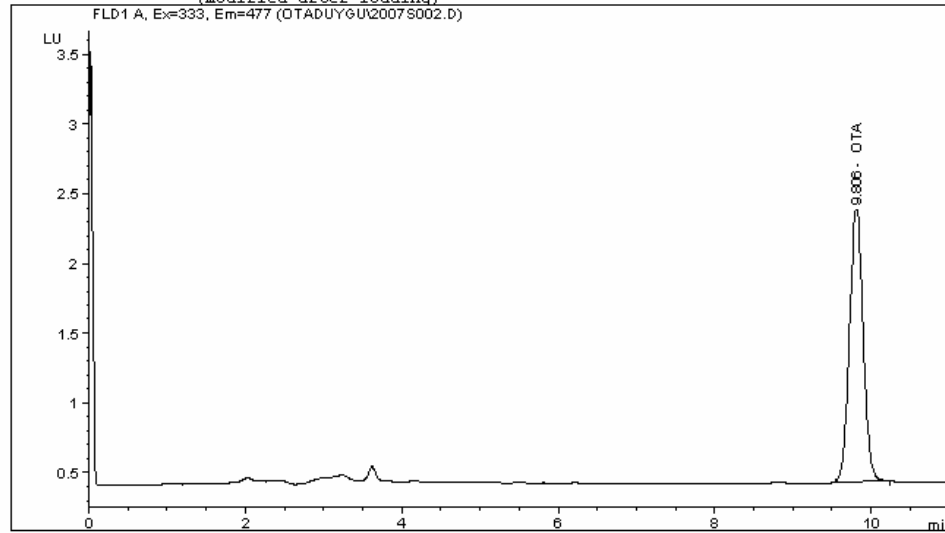
- Şişmanoğlu, G., Heperkan, D.,** 2003. Zeytinde Sitrinin Oluşumuna Süre, Sıcaklık Ve Tuz Konsantrasyonunun Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Tebliğ 2002/63,** 2003. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü.*
- Thacker, H.L., Carlton, W.W. and Sansing, G.A.,** 1977. Citrinin mycotoxicosis in the guinea pig, *Food and Cosmetics Technology*, **15**(6), pp. 553-561.
- Triverdi, A., Doi, E. and Kitabatake, N.,** 1992. Cytotoxicity of Citrinin Heated at Temperatures Above 100°C, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** (3), pp. 423-426.
- Truckness, M.W., and Pohland, A.E.,** 2000. *Mycotoxin Protocols*, Totowa, N.J: Humana Press, pp. 195- 203.
- TS-774,** 2003. Sofralık Zeytin Standardı, *Türk Standartları Entitüsü*, Ankara.
- Tunalıoğlu, R.,** 2003. Sofralık Zeytin. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, *Bakış*, **4** (5), pp.1-4.
- Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, and Martlbauer, E.,** 2000. Co-occurrence of Ochratoxin A and Citrinin in Cereals from Bulgarian Villages with a History of Balkan Endemic Nephropathy, *J. of Agric. Food Chem.*, **48**, pp.2483-2488.
- Weidenbörner, M.,** 2001. *Encyclopedia of Mycotoxins*, Springer, Berlin, New York.
- Wijnands, L.M. and Leusden, F.M.,** 2000. An Overview of Adverse Health Effects Caused by Mycotoxins and Bioassay for Their Detection, Ruksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, RIVM Report – 257852004.
- Wood, B.J.B.,** 1998. *Microbiology of Fermented Foods*, 2nd Ed., Blackie Academic and Professional, UK, pp. 59-67.
- Yıldız, N.,** 2003. Zeytin ve Madencilik. Maden Mühendisleri Odası Yayınları, Raporlar.

EK A: ZEYTİN ÖRNEKLERİNE AİT HPLC KROMATOGRAMLARI

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\OTADUYGU\2007S002.D

Sample Name: 20/7/siyah

```
=====  
Injection Date : 04.05.2006 16:43:13  
Sample Name    : 20/7/siyah           Location : Vial 1  
Acq. Operator  : Funda  
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M  
Last changed   : 04.05.2006 10:30:04 by Funda  
                (modified after loading)  
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M  
Last changed   : 24.05.2006 10:46:52 by Funda  
                (modified after loading)  
=====
```



External Standard Report

```
=====  
Sorted By      :      Signal  
Calib. Data Modified : 04.05.2006 10:30:00  
Multiplier     :      2.0000  
Dilution       :      1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs  
=====
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ppb]	Grp	Name
9.806	BBA	23.85620	6.06038e-1	28.91554		OTA

Totals : 28.91554

Results obtained with enhanced integrator!

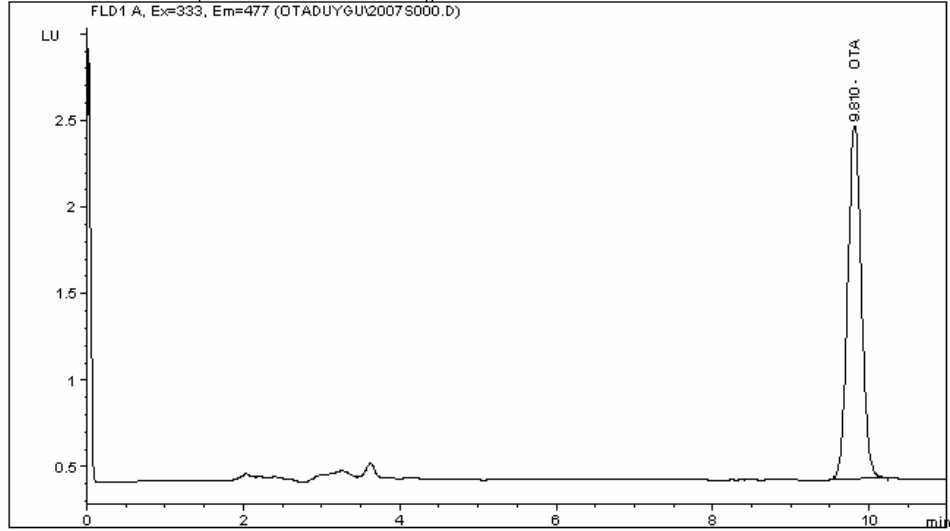
*** End of Report ***

Instrument 1 24.05.2006 10:48:01 Funda

Page 1 of 1

```

=====
Injection Date : 04.05.2006 16:18:25
Sample Name    : 20/7/siyah                Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 04.05.2006 10:30:04 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 10:49:01 by Funda
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 04.05.2006 10:30:00
Multiplier     : 2.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

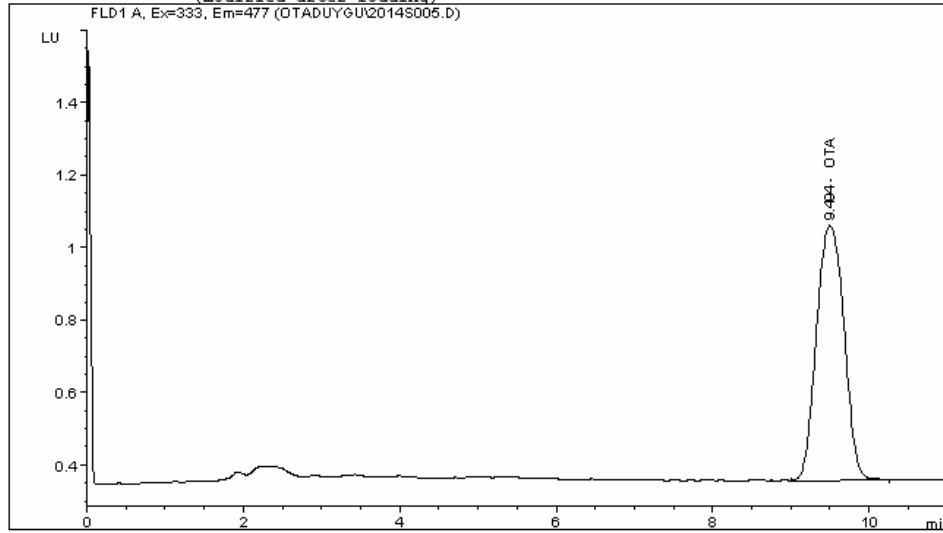
RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.810	BBA	24.78343	6.05182e-1	29.99698		OTA

Totals : 29.99698

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

=====
Injection Date : 29.03.2006 17:32:16
Sample Name : siyah 20/14.gun Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed : 29.03.2006 16:18:55 by Funda
(modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed : 24.05.2006 10:56:42 by Funda
(modified after loading)



=====
External Standard Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.494	PBA	17.27033	6.14766e-1	10.61721		OTA

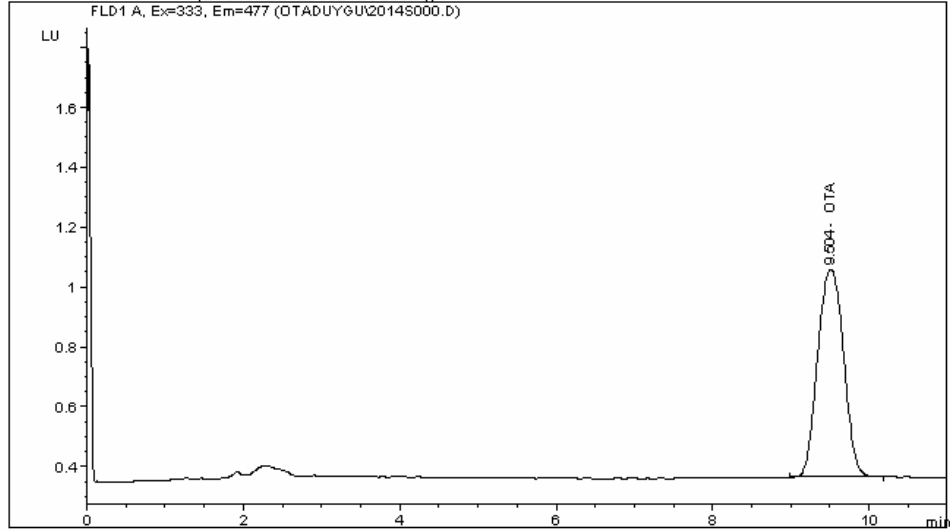
Totals : 10.61721

Results obtained with enhanced integrator!

=====
*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 29.03.2006 16:18:47
Sample Name   : siyah 20/14.gün           Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 29.03.2006 16:18:55 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 24.05.2006 10:58:32 by Funda
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.504	BBA	16.04042	6.17190e-1	9.89999		OTA

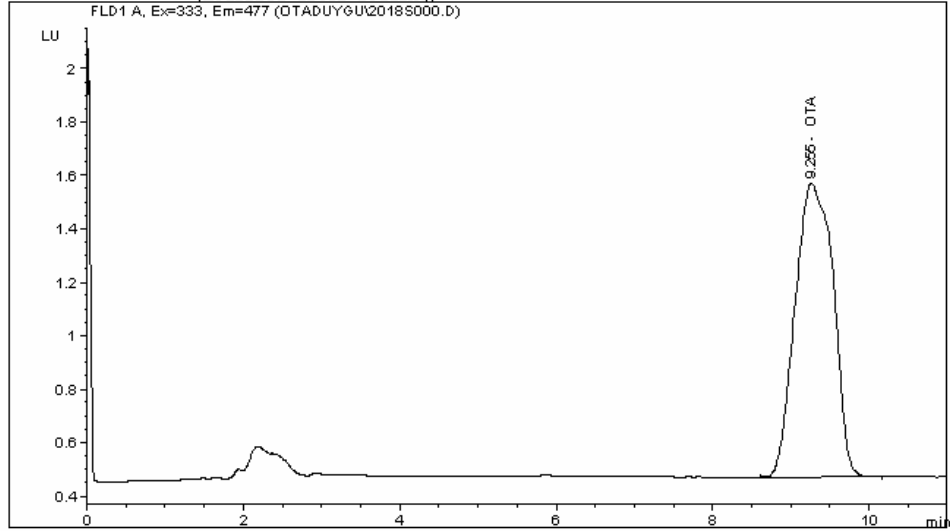
Totals : 9.89999

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 01.04.2006 13:26:15
Sample Name    : 20/18. grn siyah          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 01.04.2006 11:42:21 by Funda
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 11:04:24 by Funda
                  (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.255	PBA	37.23396	5.97815e-1	22.25903		OTA

Totals : 22.25903

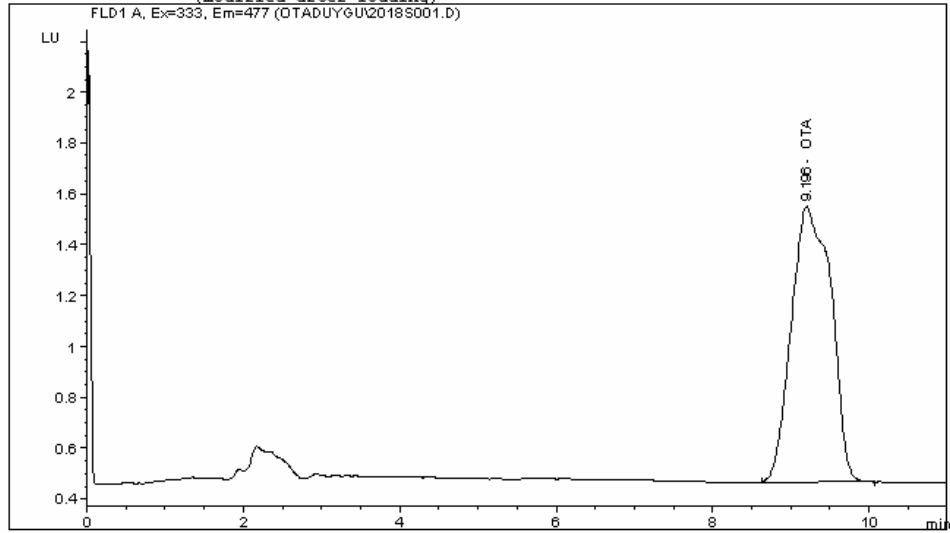
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***


```

=====
Injection Date : 01.04.2006 13:38:44
Sample Name    : 20/18. gün siyah          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 01.04.2006 13:40:51 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 11:05:52 by Funda
                (modified after loading)

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.196	BBA	38.26088	5.97422e-1	22.85788		OTA

Totals : 22.85788

Results obtained with enhanced integrator!

```

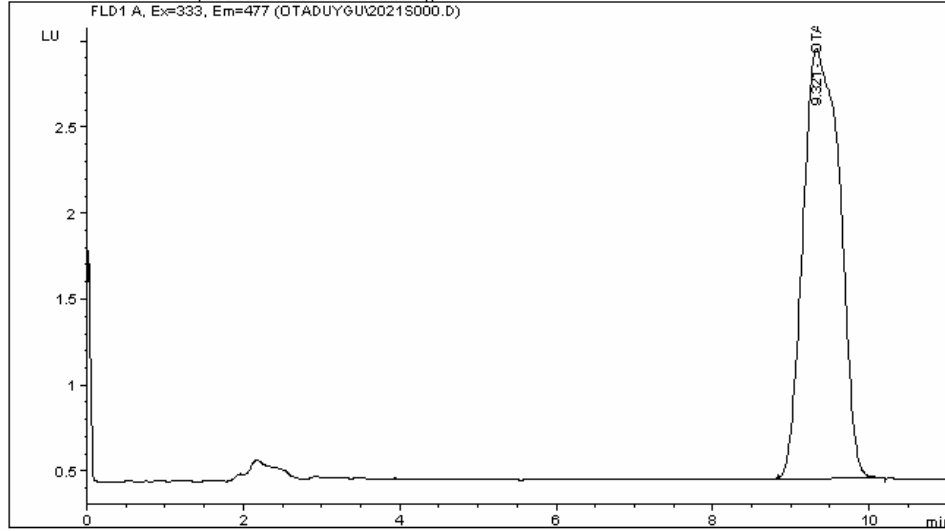
=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 01.04.2006 14:45:06
Sample Name    : 20/21. gün siyah           Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 01.04.2006 13:54:22 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 11:09:09 by Funda
                (modified after loading)

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.321	BBA	81.82180	5.89824e-1	48.26049		OTA

Totals : 48.26049

Results obtained with enhanced integrator!

```

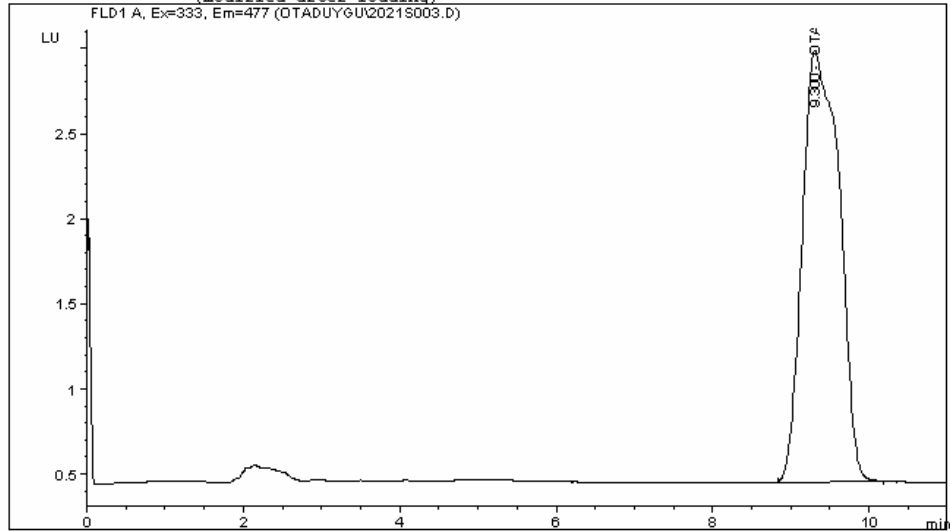
=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date   : 01.04.2006 15:22:32
Sample Name     : 20/21. grn siyah           Location : Vial 1
Acq. Operator   : Funda
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed    : 01.04.2006 13:54:22 by Funda
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed    : 24.05.2006 11:10:57 by Funda
                  (modified after loading)

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.300	BBA	82.99721	5.89730e-1	48.94593		OTA

Totals : 48.94593

Results obtained with enhanced integrator!

```

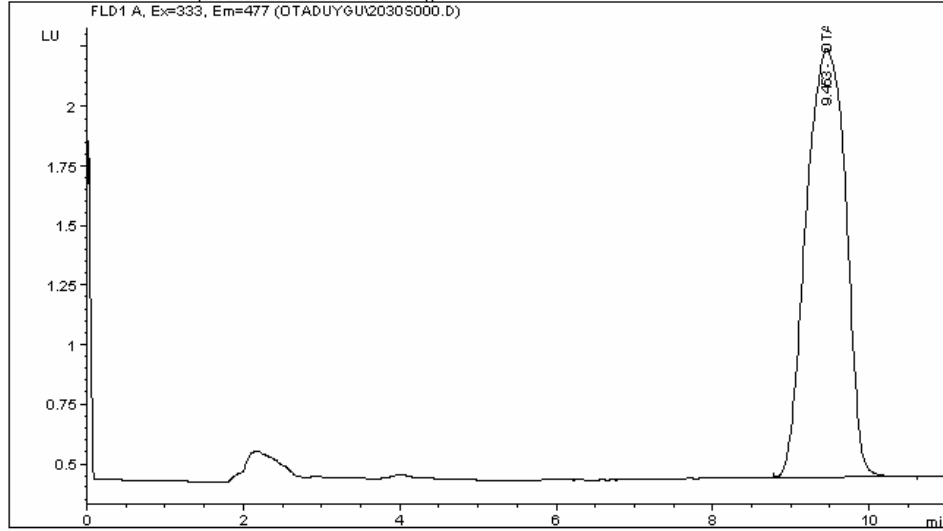
=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 02.04.2006 14:55:50
Sample Name    : 20/30.gün siyah          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 02.04.2006 12:46:50 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 11:14:04 by Funda
                (modified after loading)

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.453	BBA	63.38865	5.91765e-1	37.51117		OTA

Totals : 37.51117

Results obtained with enhanced integrator!

```

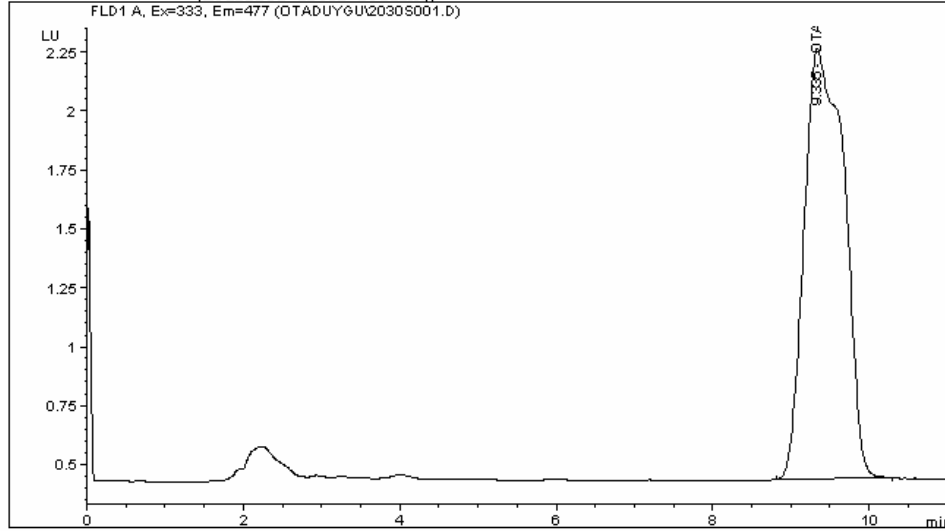
=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 02.04.2006 15:07:41
Sample Name   : 20/30.gün siyah           Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 02.04.2006 12:46:50 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 24.05.2006 11:14:46 by Funda
                (modified after loading)

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.335	BBA	64.93906	5.91559e-1	38.41530		OTA

Totals : 38.41530

Results obtained with enhanced integrator!

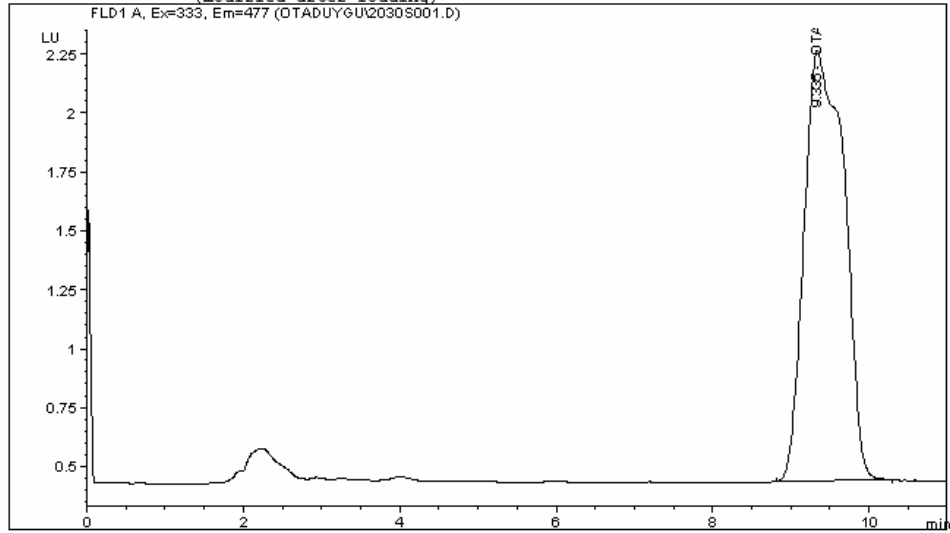
```

=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 02.04.2006 15:07:41
Sample Name    : 20/30.gün siyah          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 02.04.2006 12:46:50 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 11:14:46 by Funda
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.335	BBA	64.93906	5.91559e-1	38.41530		OTA

Totals : 38.41530

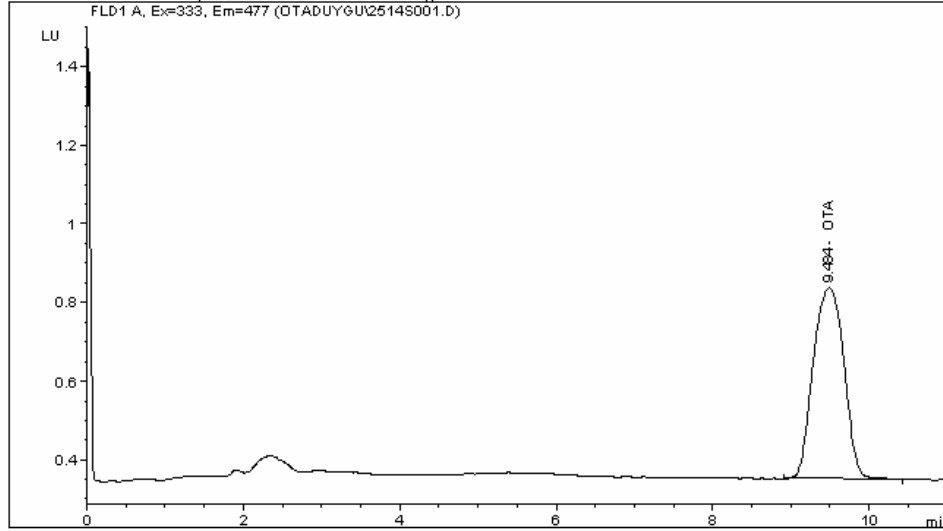
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 29.03.2006 17:59:19
Sample Name    : siyah 25/14.gün          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 29.03.2006 17:58:06 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 11:32:28 by Funda
                (modified after loading)

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.484	BBA	13.34933	6.24052e-1	8.33068		OTA

Totals : 8.33068

Results obtained with enhanced integrator!

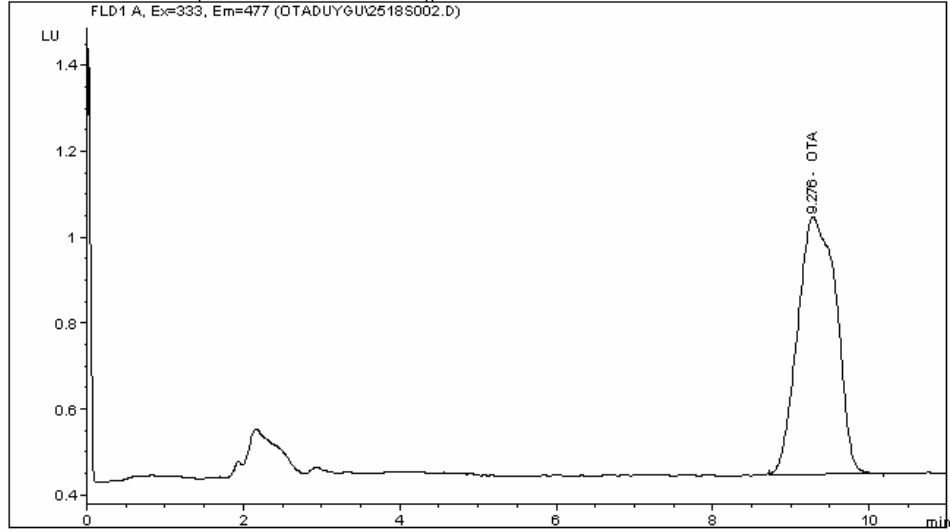
```

=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 01.04.2006 12:43:50
Sample Name   : 25/18. grn siyah           Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 01.04.2006 11:42:21 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 24.05.2006 11:37:49 by Funda
                (modified after loading)
    
```



```

=====
External Standard Report
=====
    
```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.276	BBA	20.46588	6.09830e-1	12.48070		OTA

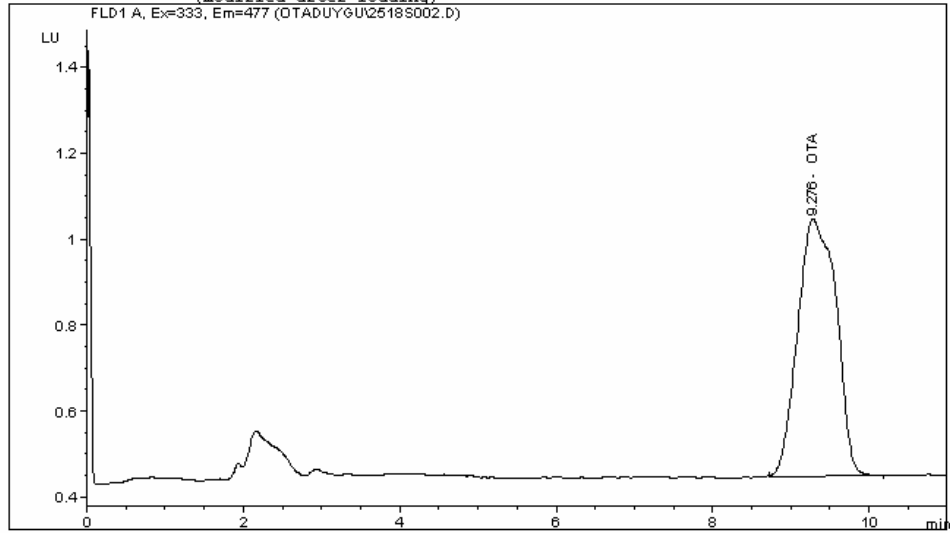
Totals : 12.48070

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
    
```


=====
Injection Date : 01.04.2006 12:43:50
Sample Name : 25/18. grn siyah Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed : 01.04.2006 11:42:21 by Funda
(modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed : 24.05.2006 11:37:49 by Funda
(modified after loading)



=====
External Standard Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ppb]	Grp	Name
9.276	BBA	20.46588	6.09830e-1	12.48070		OTA

Totals : 12.48070

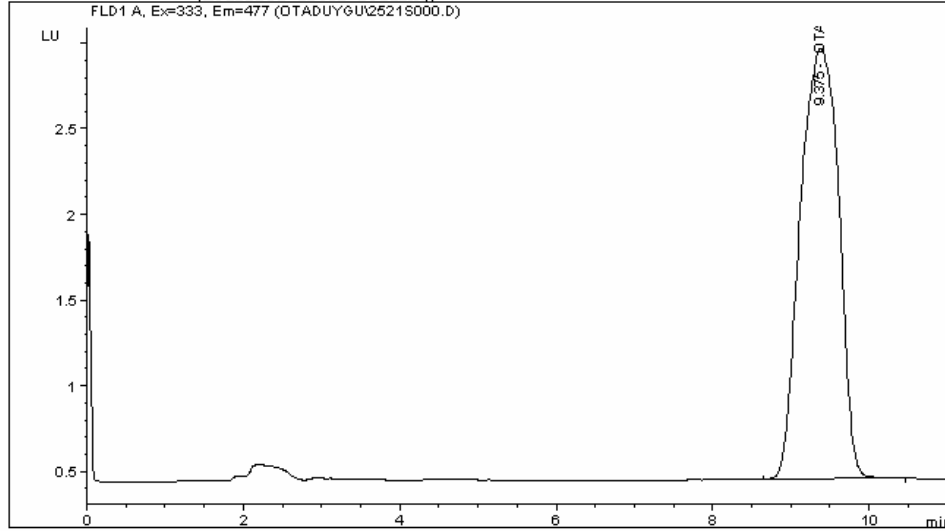
Results obtained with enhanced integrator!

=====
*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 01.04.2006 14:01:21
Sample Name   : 25/21. grn siyah           Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 01.04.2006 13:54:22 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 24.05.2006 11:40:38 by Funda
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.375	BBA	85.98814	5.89501e-1	50.69010		OTA

Totals : 50.69010

Results obtained with enhanced integrator!

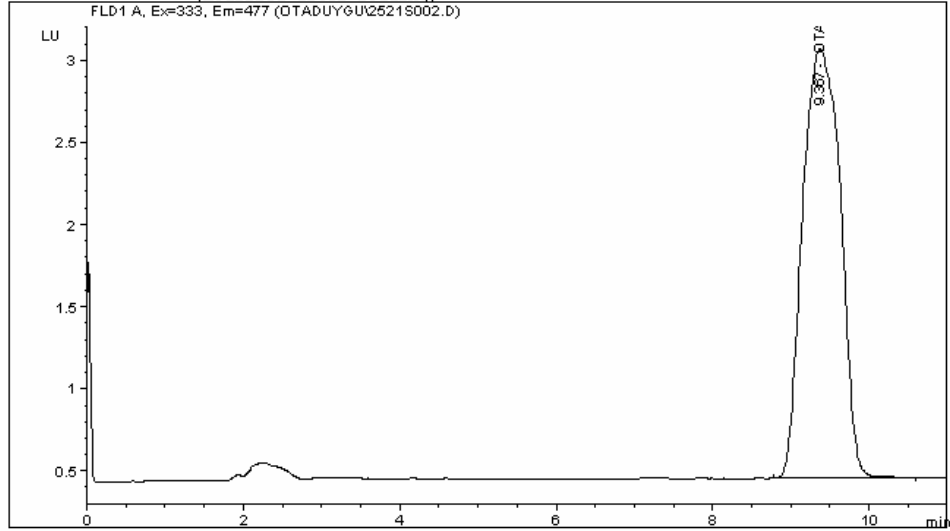
```

=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 01.04.2006 14:30:03
Sample Name   : 25/21. grn siyah           Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 01.04.2006 13:54:22 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 24.05.2006 11:41:54 by Funda
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.367	BBA	87.88326	5.89364e-1	51.79524		OTA

Totals : 51.79524

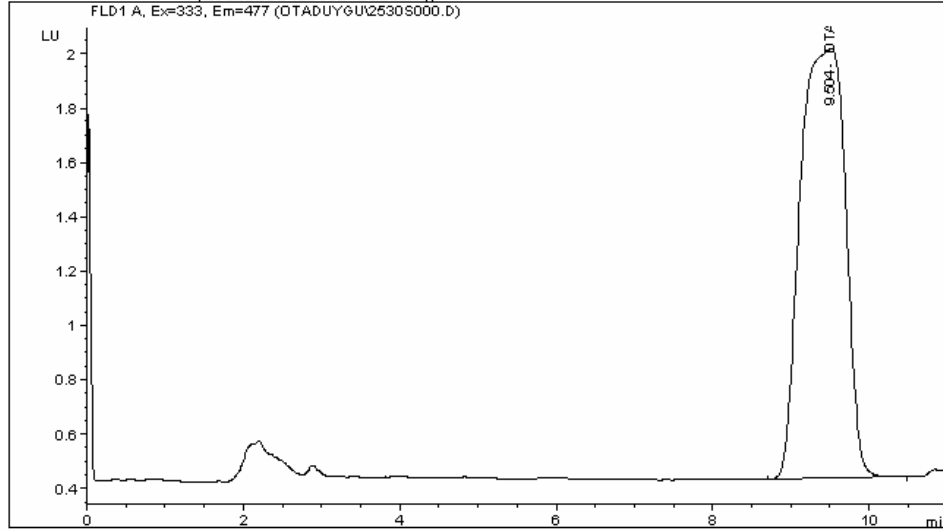
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 02.04.2006 15:21:08
Sample Name    : 25/30.gün siyah          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 02.04.2006 12:46:50 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 11:50:26 by Funda
                (modified after loading)

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.504	PBA	63.22953	5.91787e-1	37.41838		OTA

Totals : 37.41838

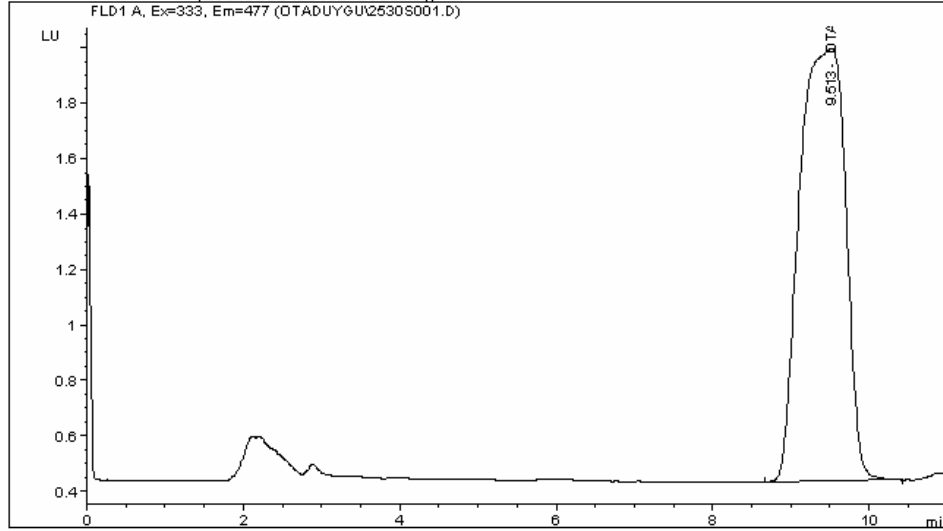
Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

=====
Injection Date : 02.04.2006 15:32:46
Sample Name : 25/30.gün siyah Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed : 02.04.2006 12:46:50 by Funda
(modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed : 24.05.2006 11:51:06 by Funda
(modified after loading)



=====
External Standard Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.513	PBA	63.53016	5.91746e-1	37.59369		OTA

Totals : 37.59369

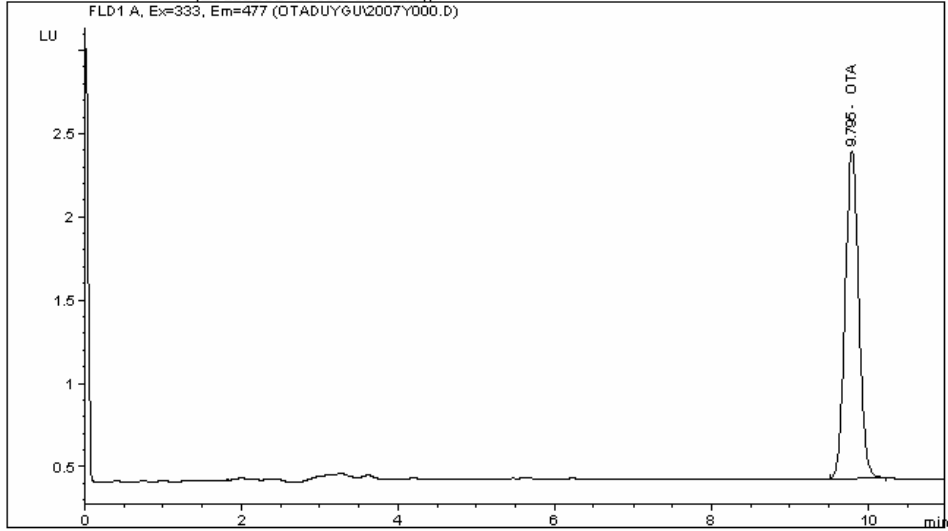
Results obtained with enhanced integrator!

=====
*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 04.05.2006 17:45:45
Sample Name    : 20/7/yebil                Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 04.05.2006 10:30:04 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 10:51:14 by Funda
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 04.05.2006 10:30:00
Multiplier     : 2.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.795	BBA	23.80610	6.06087e-1	28.85711		OTA

Totals : 28.85711

Results obtained with enhanced integrator!

```

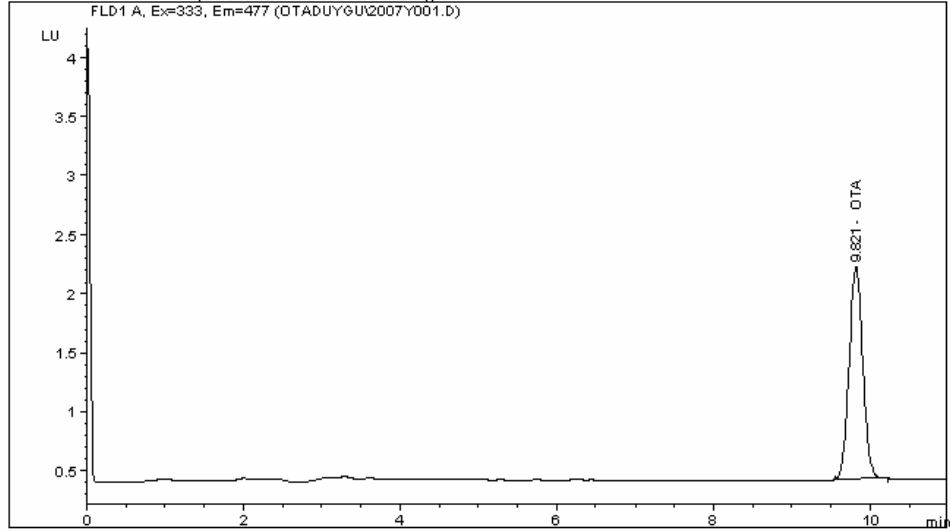
=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 04.05.2006 17:59:15
Sample Name    : 20/7/yebil                Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 04.05.2006 10:30:04 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 10:52:35 by Funda
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 04.05.2006 10:30:00
Multiplier     : 2.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.821	BBA	21.89026	6.08094e-1	26.62267		OTA

Totals : 26.62267

Results obtained with enhanced integrator!

```

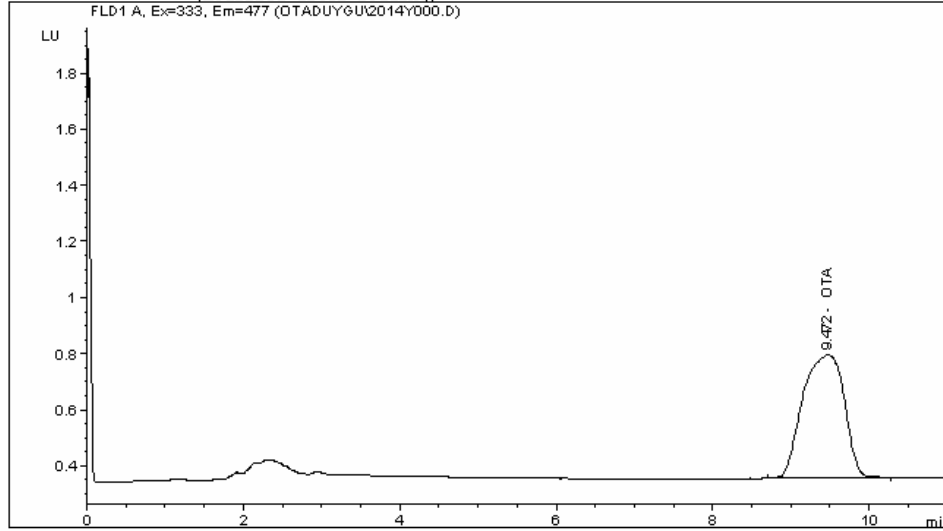
=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 29.03.2006 18:51:39
Sample Name    : yebil 20/14.gün          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 29.03.2006 17:58:06 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 10:59:31 by Funda
                (modified after loading)

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.472	BBA	16.26625	6.16718e-1	10.03168		OTA

Totals : 10.03168

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

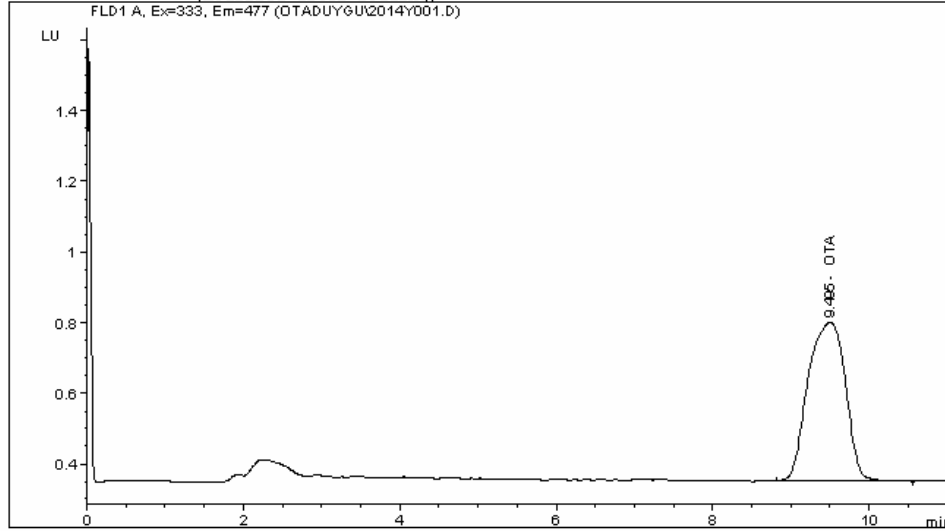
```



```

=====
Injection Date : 29.03.2006 19:02:59
Sample Name    : yebil 20/14.gün          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 29.03.2006 17:58:06 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 10:59:59 by Funda
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.495	BBA	14.99244	6.19569e-1	9.28886		OTA

Totals : 9.28886

Results obtained with enhanced integrator!

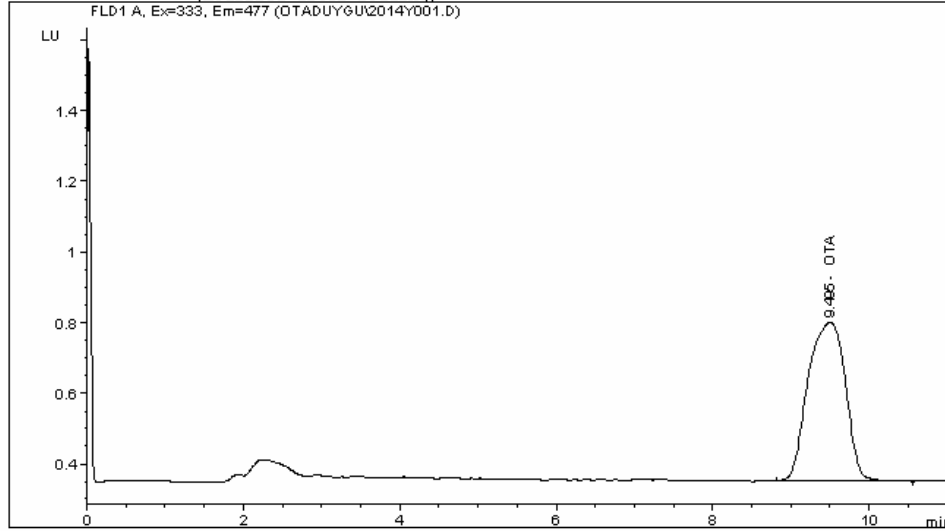
```

=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 29.03.2006 19:02:59
Sample Name    : yebil 20/14.gün          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 29.03.2006 17:58:06 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 10:59:59 by Funda
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.495	BBA	14.99244	6.19569e-1	9.28886		OTA

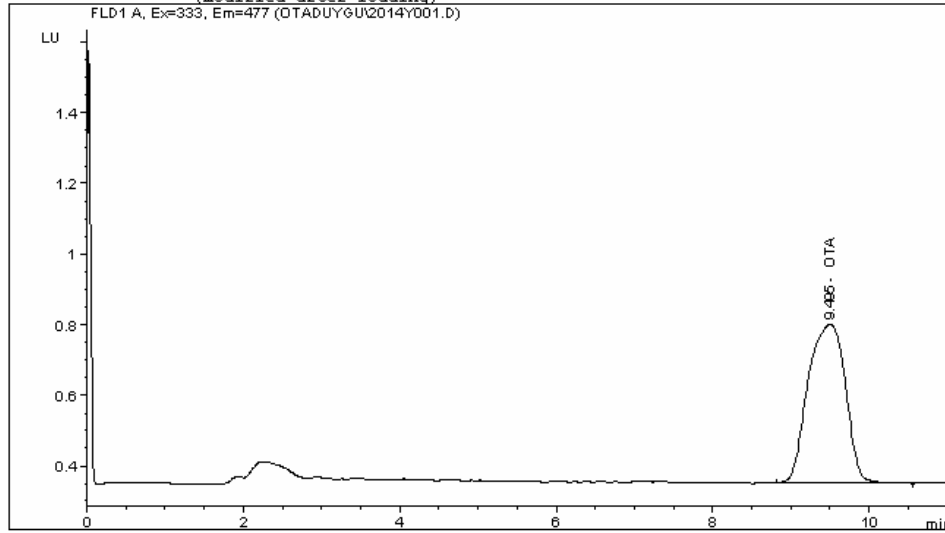
Totals : 9.28886

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 29.03.2006 19:02:59
Sample Name   : yebil 20/14.gün           Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 29.03.2006 17:58:06 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 24.05.2006 10:59:59 by Funda
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ppb]	Grp	Name
9.495	BBA	14.99244	6.19569e-1	9.28886		OTA

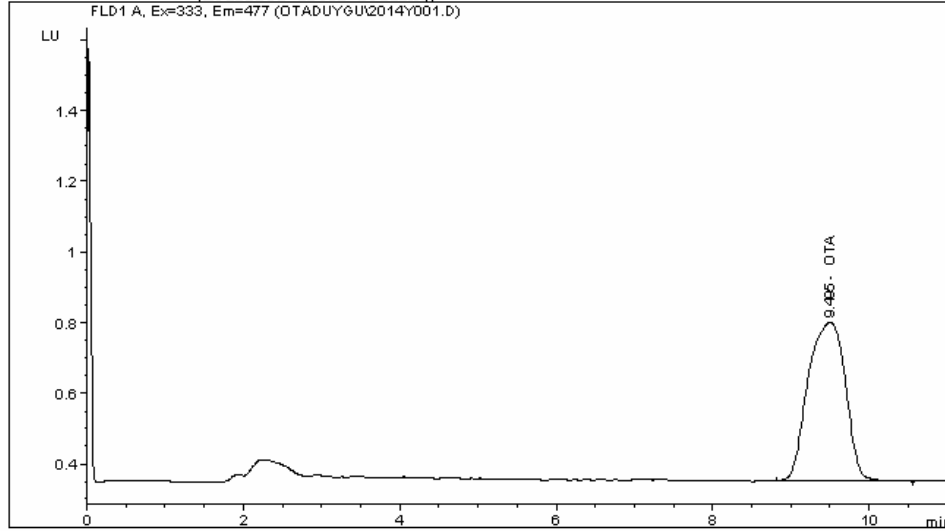
Totals : 9.28886

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 29.03.2006 19:02:59
Sample Name    : yebil 20/14.gün          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 29.03.2006 17:58:06 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 10:59:59 by Funda
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

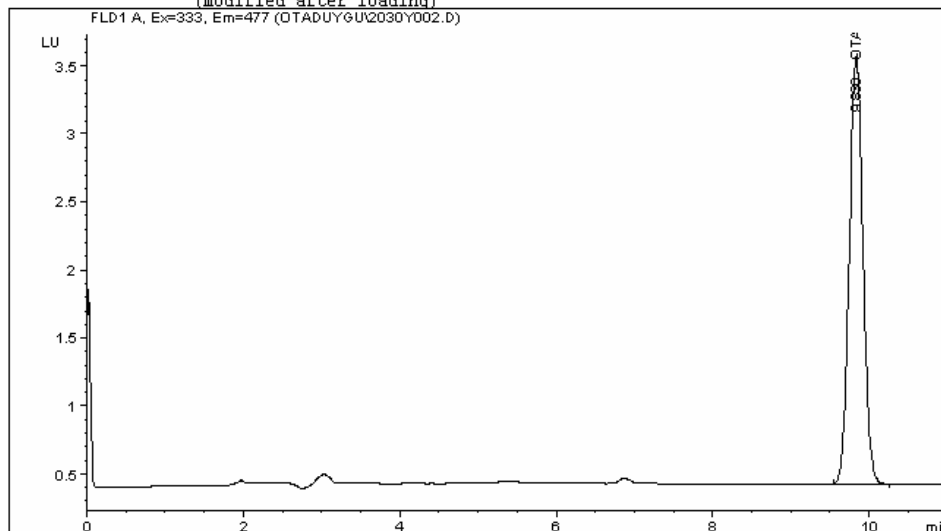
RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ppb]	Grp	Name
9.495	BBA	14.99244	6.19569e-1	9.28886		OTA

Totals : 9.28886

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```
=====
Injection Date : 06.05.2006 15:03:38
Sample Name    : 20/30.gün/yeşil          Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 06.05.2006 14:17:28 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 11:16:44 by Funda
                (modified after loading)
=====
```



```
=====
External Standard Report
=====
```

```
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime	Type	Area	Amt/Area	Amount	Grp	Name
[min]		LU *s		[ppb]		
9.830	BBA	38.53843	5.97319e-1	23.01973		OTA

Totals : 23.01973

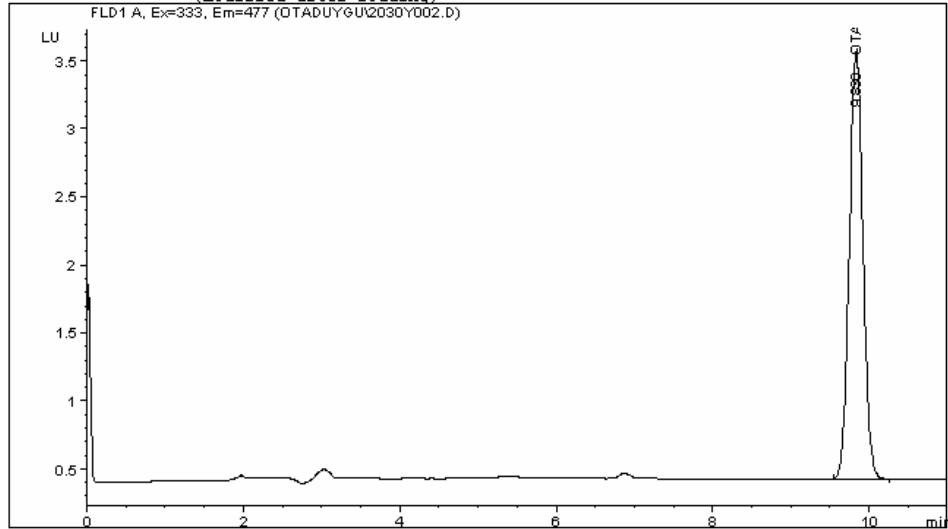
Results obtained with enhanced integrator!

```
=====
*** End of Report ***
=====
```

```

=====
Injection Date   : 06.05.2006 15:03:38
Sample Name     : 20/30.gün/yeşil           Location : Vial 1
Acq. Operator   : Funda
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed    : 06.05.2006 14:17:28 by Funda
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed    : 24.05.2006 11:16:44 by Funda
                  (modified after loading)
=====

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.830	BBA	38.53843	5.97319e-1	23.01973	OTA	

Totals : 23.01973

Results obtained with enhanced integrator!

```

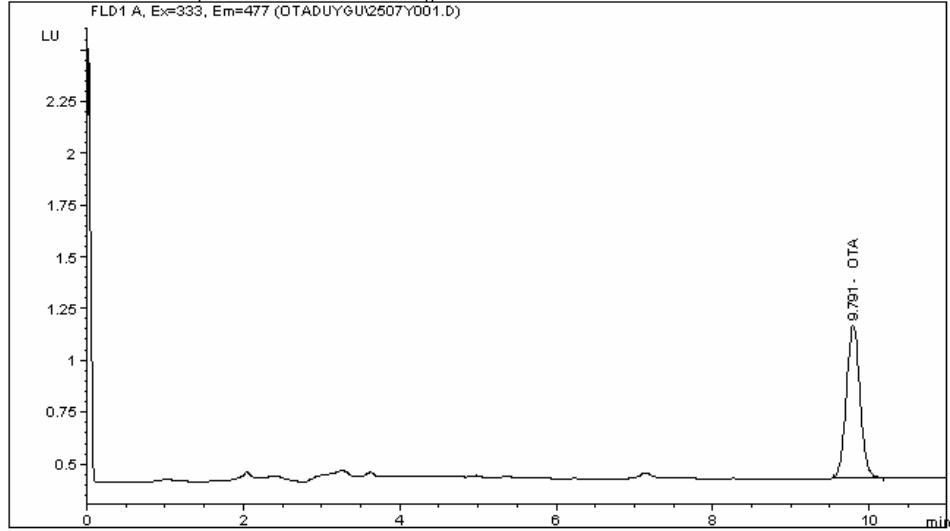
=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 04.05.2006 16:01:52
Sample Name    : 25/7/yebil                Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 04.05.2006 10:30:04 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 11:29:27 by Funda
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     :      2.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.791	BBA	8.88464	6.44605e-1	11.45418		OTA

Totals : 11.45418

Results obtained with enhanced integrator!

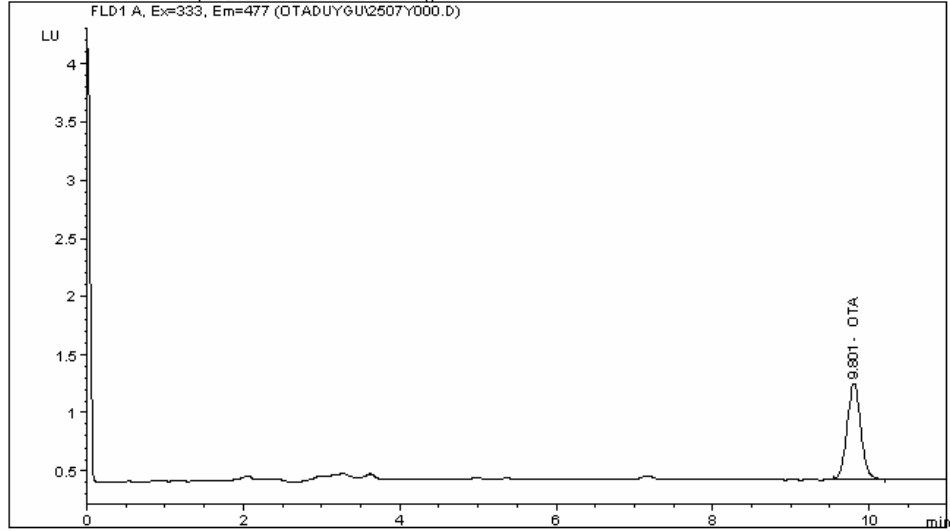
```

=====
*** End of Report ***
=====

```

```

=====
Injection Date : 04.05.2006 15:48:25
Sample Name    : 25/7/yebil                Location : Vial 1
Acq. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 04.05.2006 10:30:04 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 11:24:42 by Funda
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 2.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.801	BBA	9.95994	6.37971e-1	12.70829		OTA

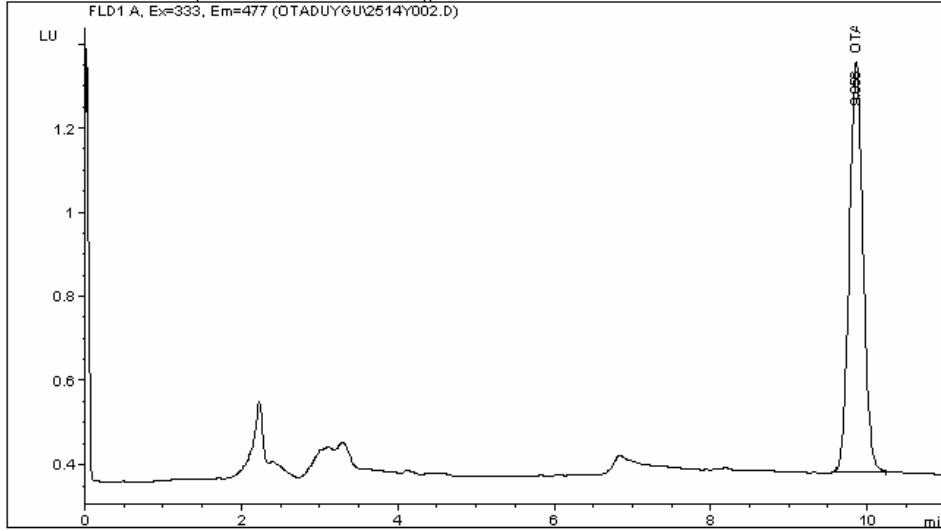
Totals : 12.70829

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***


```

=====
Injection Date : 05.05.2006 12:53:55
Sample Name   : 25/14.gün/yeşil           Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 05.05.2006 11:05:32 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 24.05.2006 11:34:59 by Funda
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     : 2.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

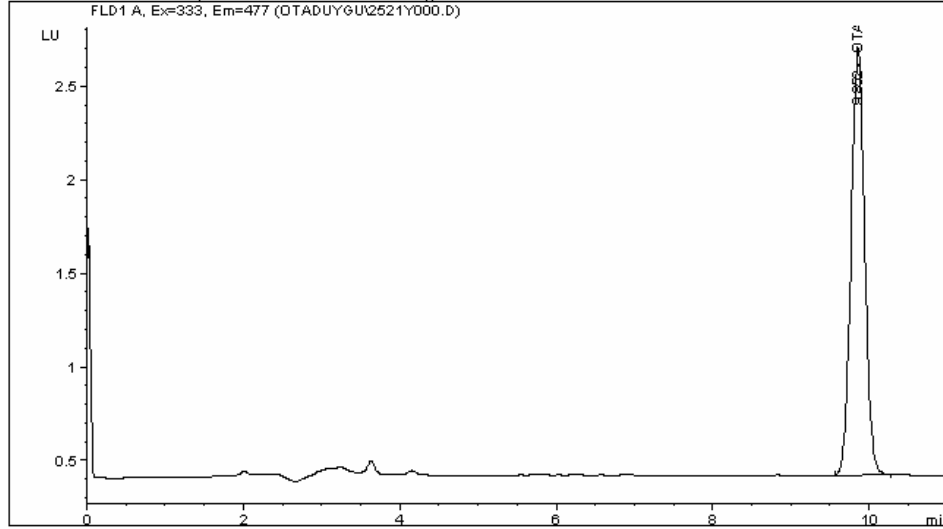
RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.856	BBA	11.89144	6.29066e-1	14.96101		OTA

Totals : 14.96101

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

=====
Injection Date : 06.05.2006 15:19:01
Sample Name : 25/21.gün/yeşil Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed : 06.05.2006 14:17:28 by Funda
(modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed : 24.05.2006 11:42:46 by Funda
(modified after loading)
=====



=====
External Standard Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.852	BBA	27.58310	6.02946e-1	16.63112	OTA	

Totals : 16.63112

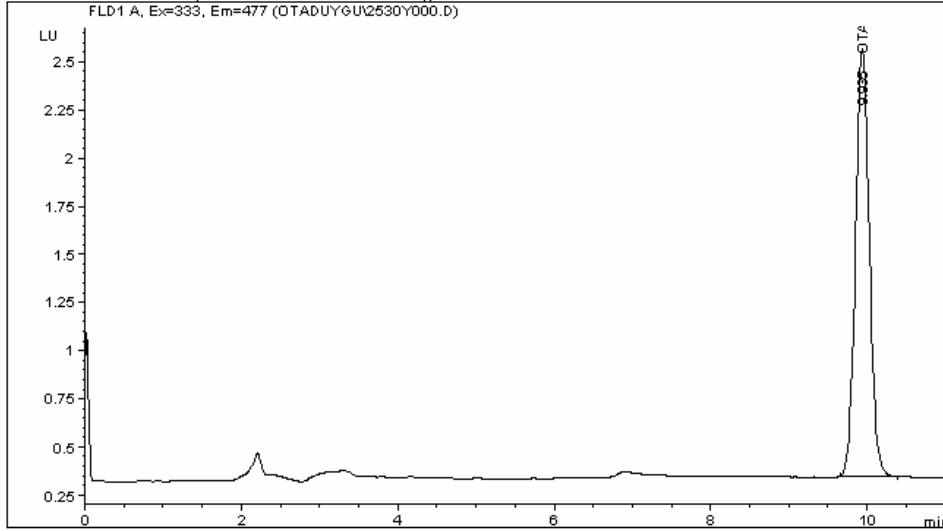
Results obtained with enhanced integrator!

=====
*** End of Report ***
=====

```

=====
Injection Date : 05.05.2006 12:03:20
Sample Name   : 25/30.gün/yeşil           Location : Vial 1
Acq. Operator : Funda
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 05.05.2006 11:05:32 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed  : 24.05.2006 11:52:06 by Funda
                (modified after loading)

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 24.05.2006 10:56:00
Multiplier     :      2.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ppb]	Grp	Name
9.935	BBA	27.65151	6.02897e-1	33.34203		OTA

Totals : 33.34203

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

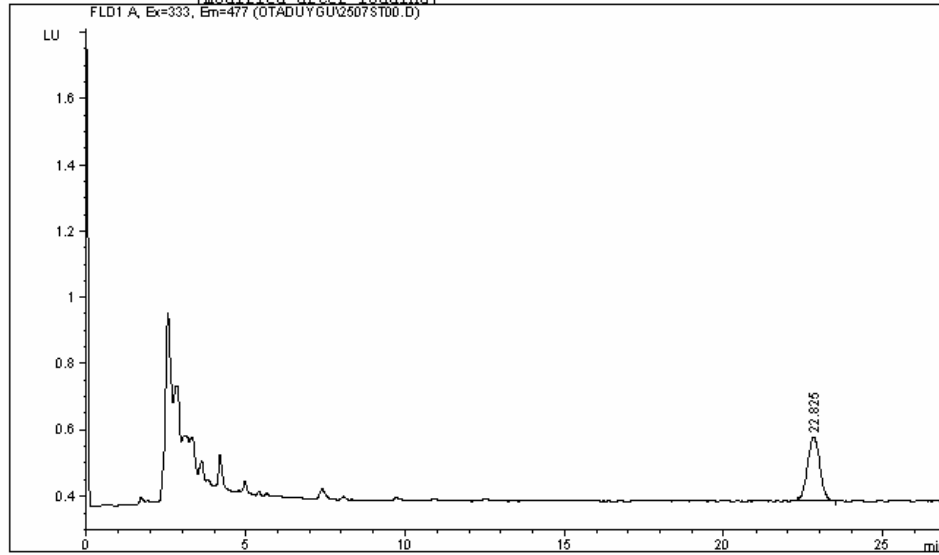
EK B: OKRATOKSİN A METİL ESTER KROMATOGRAMI

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\OTADUYGU\2507ST00.D

Sample Name: 25/07/ siyah tür

türev

```
=====
Injection Date : 05.05.2006 15:00:27
Sample Name    : 25/07/ siyah tür           Location : Vial 1
Acc. Operator  : Funda
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 05.05.2006 14:29:19 by Funda
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTADUYGU.M
Last changed   : 24.05.2006 15:26:57 by Funda
                (modified after loading)
=====
```



External Standard Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 04.05.2006 10:30:00
Multiplier     : 2.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=477

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [pg]	Grp	Name
9.900	-	-	-	-	-	OTA

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

Instrument 1 24.05.2006 15:28:32 Funda

Page 1 of 2

EK C: İSTATİSTİK HESAP TABLOLARI

Tablo C.1 Siyah Zeytinde Farklı Sıcaklık Dereceleri İçin Varyans Analizi

Varyasyon Kaynağı	KT	SD	KO	Fo
Süre	2107,79	4	526,95	-
Sıcaklık	56,31	1	56,31	2,36
Hata	95,38	4	23,85	-
Toplam	2259,48	9		-

α : 0.05

Tablo C.2 Yeşil Zeytinde Farklı Sıcaklık Dereceleri İçin Varyans Analizi

Varyasyon Kaynağı	KT	SD	KO	Fo
Süre	622,74	4	155,69	-
Sıcaklık	0,38	1	0,38	<1
Hata	197,21	4	49,3	-
Toplam	820,33	9	-	-

α : 0.05

Tablo C.3 20°C'de Siyah ve Yeşil Zeytin İçin Varyans Analizi

Varyasyon Kaynağı	KT	SD	KO	Fo
Süre	1198,8	4	299,7	-
Sıcaklık	115,06	1	115,06	5,82
Hata	79,06	4	19,765	-
Toplam	1392,92	9	-	-

α : 0.05

Tablo C.4 25°C'de Siyah ve Yeşil Zeytin İçin Varyans Analizi

Varyasyon Kaynağı	KT	SD	KO	Fo
Süre	1558,48	4	389,62	-
Sıcaklık	5,86	1	5,86	<1
Hata	186,77	4	46,7	-
Toplam	1751,11	9	-	-

α : 0.05

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İstanbul'da doğmuştur. 1995 yılında Özel Ahmet Şimşek Fen Lisesi'nden mezun olmuştur. Lisans öğrenimini Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde tamamlamıştır. 2001 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans çalışmasına başlamıştır. 2001-2004 yılları arasında Sentez Kalite Kontrol Laboratuvarı'nda Mikrobiyoloji Laboratuvarı Sorumlusu olarak çalışmıştır. 2005 yılından itibaren ALBİO Kimyevi Maddeler İthalat ve Tic. A.Ş.'de Ürün Sorumlusu olarak görevine devam etmektedir. Evlidir.