İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SICAKLIĞIN *ASPERGİLLUS* SECTİON *NİGRİ* ÜYELERİNİN GELİŞME ve OKRATOKSİN A OLUŞTURMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül MUTLU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU-GÜLER

HAZİRAN 2012

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SICAKLIĞIN *ASPERGİLLUS* SECTİON *NİGRİ* ÜYELERİNİN GELİŞME ve OKRATOKSİN A OLUŞTURMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül MUTLU
(506101501)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU-GÜLER

HAZİRAN 2012

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506101501 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Ayşegül MUTLU**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **" SICAKLIĞIN *ASPERGİLLUS* SECTİON *NİGRİ* ÜYELERİNİN GELİŞME ve OKRATOKSİN A OLUŞTURMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ"** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU-GÜLER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Dilek HEPERKAN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof.Dr. Muammer UĞUR
İstanbul Üniversitesi

Teslim Tarihi : **4 Mayıs 2012**
Savunma Tarihi : **8 Haziran 2012**

ÖNSÖZ

Mikotoksin kontaminasyonu dünya çapında gıda güvenliğinin yanı sıra insan sağlığı, ülke ekonomisi ve ürün kaybı açısından önem taşımaktadır. *A.* section *Nigri* üyeleri kuru meyvelerden sıklıkla izole edilen okratoksin A üreticisi küflerdir. *A.* section *Nigri* üyelerinin potansiyel okratoksin A üreticisi olduklarının bilinmesi bu grubun önemini arttırmıştır. Küf gelişmesi ve okratoksin üretim koşullarının belirlenmesi, incirin üretiminden tüketim aşamasına kadar mikotoksin oluşumunun sınırlandırılmasını sağlayabilir.

İlk olarak, sadece danışmanım olarak değil, her konuda desteğini ve güvenini hissettirdiği için değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU-GÜLER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmam sırasında her türlü soruma sabırla cevap veren Ceren DAŞKAYA DİKMEN ve Sibel ERTUĞRUL'a, ve yine laboratuvar çalışmalarımı zevkli hale getiren arkadaşım Deniz DİNÇER'e teşekkür ederim. Ayrıca maddi desteklerinden dolayı TUBİTAK BİDEB'e, manevi desteklerinden dolayı da Güneş KAHRAMAN ve Serdar İNGÖK'e teşekkür ederim.

Son olarak, tez çalışmamın her anında beni hoşgörü ile karşılayan, sadece yüksek lisans değil bütün öğrenim hayatımca maddi ve manevi destekleri ile her şeyin üstesinden gelmemi sağlayan aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2012

Ayşegül MUTLU
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
KISALTMALAR ..... **ix**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xiii**
ÖZET ..... **xv**
SUMMARY ..... **xvii**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 *Aspergillus* section *Nigri* Üyesi Küfler 3
2.2 Okratoksin A 6
2.2.1 Okratoksin A üreticisi küfler 8
2.2.2 Okratoksin A üretimini etkileyen faktörler 11
2.2.3 Gıdalarda OTA varlığı 12
2.2.4 Sağlık üzerine etkileri 14
2.2.5 Yasal düzenlemeler 16
3. MATERYAL ve METOT **19**
3.1 Materyal 19
3.1.1 *Aspergillus* section *Nigri* izolatları 19
3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler 20
3.1.3 Okratoksin A analizinde kullanılan çözgen ve materyaller 21
3.2 Metot 21
3.2.1 *Aspergillus* section *Nigri* izolatlarının OTA oluşturma özelliklerinin belirlenmesi 21
3.2.1.1 Küf izolatlarının ve spor süspansiyonlarının hazırlanması 22
3.2.1.2 Okratoksin A ekstraksiyonu 22
3.2.1.3 Okratoksin A analizi için HPLC koşulları 22
3.2.1.4 OTA standartlarının hazırlanması 22
3.2.1.5 Geri kazanım oranının belirlenmesi 23
3.2.2 İzolatların optimum OTA oluşturma sıcaklıklarının belirlenmesi 23
3.2.3 İzolatların optimum gelişme sıcaklıklarının incelenmesi 24
3.3 Hesaplamalar ve İstatistiksel Analiz 24
4. BULGULAR ve TARTIŞMA **25**
4.1 *Aspergillus* section *Nigri* Üyesi Küflerin Okratoksin A Üretimleri 25
4.2 *Aspergillus* section *Nigri* Üyesi Küflerin Gelişimine Sıcaklığın Etkisi 28
4.3 *Aspergillus* section *Nigri* Üyesi Küflerin OTA Üretimine Sıcaklığın Etkisi 36
4.4 *Aspergillus* section *Nigri* Üyesi Küflerin Gelişme ve OTA Üretimleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi 43
5. SONUÇ ve ÖNERİLER **47**
KAYNAKLAR **49**
EKLER **59**

ÖZGEÇMİŞ.....71

KISALTMALAR

a_w **:** Su aktivitesi
BEN **:** Balkan Endemik Nefropatisi
CYA **:** Czapek Yeast Ekstract Agar
EC **:** Avrupa Birliği Komisyonu
EFSA **:** Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı
FB_2 **:** Fumonisin B_2
FB_4 **:** Fumonisin B_4
HPLC **:** Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IARK **:** Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
MEA **:** Malt Ekstract Agar
OTA **:** Okratoksin A
TDI **:** Günlük Tolere Edilebilir Limit
YES **:** Yeast Ekstract Sucrose

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus* section *Nigri* üyesi *A.carbonarius* ve *A. niger*'in ürettikleri OTA miktarları. 10
Çizelge 2.2 : Türkiye ve Avrupa Birliği'nde gıdalarda bulunmasına izin verilen okratoksin A limitleri 16
Çizelge 3.1 : *Aspergillus* section *Nigri* üyesi küfler ve inceleme yapılan besiyeri....19
Çizelge 3.2 : CYA besiyeri kimyasal bileşimi 20
Çizelge 3.3 : İz metal çözeltisi kimyasal bileşimi 20
Çizelge 3.4 : Czapek çözeltisi kimyasal bileşimi 20
Çizelge 3.5 : YES besiyeri kimyasal bileşimi 21
Çizelge 3.6 : Malt ekstract agar kimyasal bileşimi 21
Çizelge 3.7 : Tween 80 çözeltisi kimyasal bileşimi 21
Çizelge 3.8 : Okratoksin A kalibrasyon çözeltisi hazırlanması 23
Çizelge 4.1 : *Aspergillus* seciton *Nigri* üyesi izolatlar ve OTA miktarları.....24
Çizelge 4.2 : İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişme hızları ve lag fazı süreleri 27
Çizelge 4.3 : *Aspergillus carbonarius* 8-04D2 izolatına ait fotoğraflar 28
Çizelge 4.4 : *Aspergillus carbonarius* 21-04D1 izolatına ait fotoğraflar 29
Çizelge 4.5 : *Aspergillus carbonarius* 46D2 izolatına ait fotoğraflar 30
Çizelge 4.6 : *Aspergillus niger* 6Y1 izolatına ait fotoğraflar.....36
Çizelge 4.7 : Farklı sıcaklıkların *Aspergillus* section *Nigri* izolatlarının OTA üretimine etkisi 36
Çizelge B.1 : *A. carbonarius* 8-04D2 izolatının OTA üretimine sıcaklığın etkisi.....63
Çizelge B.2 : *A. carbonarius* 21-04D1 izolatının OTA üretimine sıcaklığın etkisi...63
Çizelge B.3 : *A. carbonarius* 46D2 izolatının OTA üretimine sıcaklığın etkisi.....63
Çizelge B.4 : *A. niger* agg. 6Y1 izolatının OTA üretimine sıcaklığın etkisi 63
Çizelge B.5 : *A. carbonarius* 8-04D2 izolatının gelişmesine sıcaklığın etkisi 63
Çizelge B.6 : *A. carbonarius* 21-04D1 izolatının gelişmesine sıcaklığın etkisi 63
Çizelge B.7 : *A. carbonarius* 46D2 izolatının gelişmesine sıcaklığın etkisi 64
Çizelge B.8 : *A. niger* agg. 6Y1 izolatının gelişmesine sıcaklığın etkisi 64
Çizelge B.9 : *A. carbonarius* 8-04D2 izolatının lag fazı süresine sıcaklığın etkisi ...64
Çizelge B.10 : *A. carbonarius* 21-04D1 izolatının lag fazı süresine sıcaklığın etkisi 64
Çizelge B.11 : *A. carbonarius* 46D2 izolatının lag fazı süresine sıcaklığın etkisi.....64
Çizelge B.12 : *A. niger* agg. 6Y1 izolatının lag fazı süresine sıcaklığın etkisi.....64

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Okratoksin A türevlerinin kimyasal yapısı. 7
Şekil 2.2 : Avrupa'da günlük OTA alımına katkıda bulunan gıdalar 12
Şekil 3.1 : Okratoksin A kalibrasyon grafiği 23
Şekil 4.1 : 6Y1 nolu *Aspergillus niger* 6Y1 izolatının gelişme hızı ve lag fazı süresine sıcaklığın etkisi 24
Şekil 4.2 : *Aspergillus carbonarius* izolatlarının gelişme hızı ve lag fazı süresine sıcaklığın etkisi.....34
Şekil 4.3 : Okratoksin A standardına ait kromatogram 35
Şekil 4.4 : Sıcaklığın *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin OTA üretimine etkisi.....37
Şekil 4.5 : İzolatların ortalama OTA üretim miktarları 41
Şekil 4.6 : *Aspergillus niger* 6Y1 nolu izolatın gelişme ve OTA üretimi arasındaki ilişki 43
Şekil 4.7 : *Aspergillus carbonarius* 8-04D2 nolu izolatın gelişme ve OTA üretimleri arasındaki ilişki 44
Şekil 4.8 : *Aspergillus carbonarius* 21-04D1 nolu izolatın gelişme ve OTA üretimleri arasındaki ilişki. 44
Şekil 4.9 : *Aspergillus carbonarius* 46D2 nolu izolatın gelişme ve OTA üretimi arasındaki ilişki 45
Şekil A.1 : 8-04D2 izolatının gelişme eğrileri 59
Şekil A.2 : 21-04D1 izolatının gelişme eğrileri 60
Şekil A.3 : 46D2 izolatının gelişme eğrileri 61
Şekil A.4 : 6Y1 izolatının gelişme eğrileri 62
Şekil C.1 : 8-04D2 nolu izolatın 25 derecede 3.güne ait OTA kromatogramı 65
Şekil C.2 : 21-04D1 nolu izolatın 30 derecede 3.güne ait OTA kromatogramı 65
Şekil C.3 : 46D2 nolu izolatın 25 derecede 3.güne ait OTA kromatogramı 65
Şekil C.4 : 8-04D2 nolu izolatın 30 derecede 5.güne ait OTA kromatogramı 66
Şekil C.5 : 46D2 nolu izolatın 20 derecede 5.güne ait OTA kromatogramı. 66
Şekil C.6 : 6Y1 nolu izolatın 25 derecede 5.güne ait OTA kromatogramı 66
Şekil C.7 : 8-04D2 nolu izolatın 15 derecede 7.güne ait OTA kromatogramı 67
Şekil C.8 : 21-04D1 nolu izolatın 15 derecede 7.güne ait OTA kromatogramı 67
Şekil C.9 : 46D2 nolu izolatın 20 derecede 7.güne ait OTA kromatogramı 67
Şekil C.10 : 21-04D1 nolu izolatın 15 derecede 10.güne ait OTA kromatogramı 68
Şekil C.11 : 46D2 nolu izolatın 20 derecede 10.güne ait OTA kromatogramı 68
Şekil C.12 : 6Y1 nolu izolatın 20 derecede 10.güne ait OTA kromatogramı 68

ASPERGİLLUS SECTİON *NİGRİ* ÜYELERİNİN GELİŞME ve OKRATOKSİN A OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNE SICAKLIĞIN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Mikotoksinler çesitli bitkisel ve hayvansal orijinli gıdalarda yaygın olarak bulunan küflerin ürettiği düşük molekül ağırlıklı ikincil metabolitledir. Miktoksijenik küflerin dağılımı ve son üründe ki miktarları iklimsel faktörlerden ve gıda işleme koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Aspergillus section *Nigri* üyeleri OTA kontaminasyonundan başlıca sorumlu küflerdir. Okratoksin A, *Aspergillus ochraceus, A. carbonairus, A. niger* ve *Penicillium verrocosum*'un da dahil olduğu bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilmektedir. OTA, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından"Grup IIB" muhtemel karsinojen olarak sınıflandırılmıştır.

Bu çalışmanın ilk aşamasında Ege Bölgesi'nden toplanan kuru incirlerden izole edilen 30 adet *Aspergillus* section *Nigri* izolatının (10 adet *A.carbonarius*, 20 adet *A. niger* aggregate) OTA oluşturma özellikleri 25°C ve 30°C'de 7 ve 10 günlük inkübasyon süresi sonunda belirlenmiştir. *A. carbonarius* izolatlarının CYA besiyerinde %90 oranında OTA üreticisi olduğu belirlenmiştir. *A. niger* ise YES besiyerinde %45 oranında OTA üretimiştir. İzolatların 25 ve 30°C'de okratoksin A üretme özellikleri dikkate alınarak seçilen 3 adet *Aspergillus carbonarius* ve 1 adet *Aspergillus niger* agg.'in gelişmesine ve OTA üretimine sıcaklığın etkisi 8 farklı sıcaklıkta (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C) incelenmiştir. Okratoksin A üretimleri *A. carbonarius* izolatları için CYA besiyerinde, *A . niger* agg. izolatı için ise YES besiyerinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir.

İzolatların tümünün en hızlı geliştiği sıcaklık 30°C, en yavaş geliştiği sıcaklık ise 15°C'dir. 30°C'de en hızlı gelişen izolatın, günde 25,968 mm gelişen 6Y1 nolu *Aspergillus niger* agg., en yavaş gelişen izolatın ise günde 16,152 mm gelişen 46D2 nolu *Aspergillus carbonarius* olduğu saptanmıştır. Bütün izolatlar için de en uzun lag fazı süresi 15°C'dedir.

8-04D2 nolu Aspergillus carbonarius izolatının en hızlı geliştiği sıcaklık 20°C, optimum OTA ise üretimi 15°C'de gerçekleşmiştir. 21-04D2 nolu A. carbonarius izolatı ise en hızlı 25°C'de gelişirken maksimum düzeyde OTA üretimi 20°C'de gerçekleşmektedir. 46D2 nolu A. carbonarius'un optimum gelişme sıcaklığı 25°C iken OTA üretimi en fazla 20°C'de belirlenmiştir. 6Y1 nolu Aspergillus niger agg. izolatı ise en hızlı gelişmeyi 30°C'de gösterirken, optimum OTA üretimini ise A. carbonarius izolatlarına oranla çok düşük miktarda olmakla birlikte 25°C'de gerçekleştirmiştir.

DETERMINATION THE EFFECT OF TEMPERATURE ON GROWTH AND OCHRATOXIN A PRODUCTION PROPERTIES OF *ASPERGILLUS* SECTION *NIGRI* MEMBERS

SUMMARY

Mycotoxins are low molecular weight secondary metabolites that have adverse effects on humans, animals, and crops that result in illnesses and economic losses., commonly found in various plant and animal origin foods. Distribution of mycotoxin producer fungi quantities in the final product varies depending on climatic factors and food processing conditions. General interest in mycotoxins rose in 1960 when a feed-related mycotoxicosis called turkey X disease, which was later proved to be caused by aflatoxins, appeared in farm animals in England. After this importance of mycotoxins increased all over the word.

Ochratoxin A is a toxic secondary metobolite, naturally produced by some *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus* section *Nigri* members are the main producers of ochratoxin A. These mould species are capable of growing on several substrates under different environmental conditions; so contamination of ochratoxin A in food products can be seen all over the world. Its occurrence has been reported in a wide variety of foods and beverages such as cereals and cereal products, pulses, dried vine fruits (currants, raisins and sultanas), coffee, cocoa products, nuts, spices, black table olive, olive oil, wine, grape juice and beer. Ochratoxin A has also been detected in food products from non-ruminant animals exposed to ochratoxin A in animal feeding stuffs.

Ochratoxin A has been shown to be mutagenic, to cause cancer and kidney damage in a number of animal species. Teratogenic, immunotoxic and hepatotoxic effects of ochratoxin A have been determined. Ochratoxin A has been associated with Balkan Endemic Nephropathy. Balkan Endemic Nephropathy is a chronic progressive kidney disease, predominantly affect women, which may lead to death. OchratoxinA has been also linked with the development of urothelial cancer in some human populations. With regard to the animal studies and epidemiological studies on humans, Ochratoxin A has been classified as possible human carcinogen (Group IIB) by International Agency for Research on Cancer (IARC).

Exposure to ochratoxin A mainly occurs in the food chain by the consumption of the cereals and cereal products. Because of the adverse effects, maximum ochratoxin A levels in foods such as cereals, dried wine fruits, coffee and foods for infants and young children are regulated by the European Union and Turkish Food Codex.

Aspergillus section *Nigri* members especially *Aspergillus carbonarius* primarily responsible for OTA contamination in dried fruits as well as dried figs. Mould growth and mycotoxin production are affected by different environmental factors such as water activity (aw), tempature and pH.

In this study 30 isolates of *Aspergillus* section *Nigri* members (10 *Aspergillus carbonarius*, 20 A*spergillus niger* agg.), isolated from dried figs, investigated for their ochratoxin a production capacity on agar at 25 and 30°C. Ochratoxin A producer 3 isolates of *Aspergillus carbonarius* and 1 isolates of *Aspergillus niger* agg. search for growth and and OTA production capacities at eight different temprature (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40°C). Also the effect of incubation time on ochratoxin A production is aimed to evaluate changes. Last stage, it is purposed to determine the optimum growth and ochratoxin A production temprature of *Aspergillus* section *Nigri* members.

The first stage of this study was to investigate the ochratoxin producing abilities of 30 isolates of *Aspergillus* section *Nigri* members (10 *Aspergillus carbonarius*, 20 A*spergillus niger* agg.) isolated from dried figs. Ochratoxin A production properties of these isolates were determined at 25 ° C and 30 ° C for 7 and 10 day incubation. Incidence of ochratoxin A production by A*spergillus carbonarius* isolates were 90% on Czapek yeast exrtact agar. Forty five percent of *Aspergillus niger* agg. was ochratoxin A producer on yeast extract sucrose. Aspergillus carbonarius isolates were produced ochratoxin A within the range of 0,006-26,92 µg/g. *Aspergillus niger* agg. isolates were produced ochratoxin A lower levels than *Aspergillus carbonarius*.

In the second stage of the study, depending on the ochratoxin A production characteristics of isolates at 25 and 30 °C, 3 *Aspergillus carbonarius* and 1 *Aspergillus niger* agg. were selected and effect of temperature on growth and ochratoxin A production was investigated at eight different temperatures (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 °C).

Growth rate, lag phase time and ochratoxin A production properties of *A. carbonarius* and *Aspergillus niger* agg. isolates were determined on CYA and YES, respectively. The growth rate was determined by periodical measurement of two right-angled diameters of the colonies. Colony diameters vs. time was plotted and growth rates (mm/ day) were evaluated from the slope by linear regression. Lag phase for growth was determined as the time (days) to reach 5 mm of diameter The determination of OTA in culture medium was carried out by using high performanceliquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection after extraction with methanol.

None of the four isolates of *Aspergillus* section *Nigri* grown at 5 and 10°C. *Aspergillus carbonarius* isolates growth was observed between 15 and 40°C for 8-04D2, between 15 and 30°C for 21-04D1 and 46D2. *A. niger* agg. isolate grown between 15 and 40°C with an optimum at 30°C. On the other hand, there is no statistical difference between 30 and 35°C. Optimum growth rate for all isolates were determined at 30°C, and minimum growth rate at 15°C. The highest growth rate at 30°C was calculated for *Aspergillus niger* agg. 6Y1 as 25.968 mm /day. The lowest growth rate at 30°C was determined for *Aspergillus carbonarius* 46D2 as 16.152 mm/day. Statistical analysis of variance (ANOVA) showed that temperature were significantly effect the growth rate of *Aspergillus* section N*igri* members.

For all strains, the longest lag phase period was observed at 15° C. *Aspergillus* section *Nigri* 46D2 isolate have the longest lag phase period over 8 days at 15°C. The shortest lag phase period for all *Aspergillus carbonarius* isolates was determined at 25°C. On the contrary, *A. niger* agg. 6Y1 isolate had the shortest lag phase period at 40°C. Statistical analysis of variance (ANOVA) showed that temperature had significant effect on the extension of lag phase of *A. carbonarius* and *A. niger* agg.

A. carbonarius isolate produced OTA at each temperature and incubation time which growth was observed. On the other hand, temperature levels in which OTA production occurred were narrower than that for fungal growth for *Aspergillus niger* agg 6Y1. OTA amounts accumulated by the *Aspergillus carbonarius* isolates 8-04D2, 21-04D1 and 46D2 and *Aspergillus niger* agg. 6Y1 ranged from 0,01 to 26,92 µg/g. Maximum OTA production was found at 15°C and 10 day for the 8-04D2 *Aspergillus carbonarius* isolate. Optimum ochratoxin A production temperature was different from each other. *A. carbonarius* 8-04D2 produced optimum amount of OTA at 15°C, *Aspergillus carbonarius* 21-04D1 and 46D2 produced optimum amount of OTA at 20°C. *Aspergillus niger* agg. 6Y1isolate produced optimum amount of ochratoxin A at 25°C at very low levels compared to *Aspergillus carbonarius* isolates.

A. carbonarius 8-04D2 isolate grew fastest at 20°C, and its optimum ochratoxin A production was at 15°C. Optimum growth of *A. carbonarius* 21-04D1 isolate was at 25°C and maximum OTA production was determined at 20°C. *A. carbonarius* 46D2 was grown optimally at 25°C while maximum OTA production was observed at 20°C. *Aspergillus niger* agg. 6Y1 showed optimum growth at 30°C, optimum OTA production was at 25°C.

According the results of this study, *Aspergillus carbonarius* is more toxigenic than *A. niger* agg. because higher percentage of ochratoxin production capacity. For *Aspergillus* section *Nigri* members, 20-30°C is optimum for growth and 15-20°C is the optimum temperature for ochratoxin A production. There was no correlation between optimum growth temperature and ochratoxin A production in *Aspergillus* section *Nigri* members.

1. GİRİŞ

Mikotoksinler bazı küflerin gıda ve yemlerde gelişmeleri sonucunda oluşan düşük molekül ağırlıklı ikincil metabolitlerdir. Mikotoksin üreticisi olduğu bilinen 350'den fazla küf bulunmakta ve bunlara ek olarak her yıl yeni toksin üreticisi küflerin varlığı belirlenmektedir (Lobeau ve diğ., 2005; Amezqueta ve diğ., 2008).

Dünyada gıda güvenliğine karşı artan ilgiye paralel olarak gıdalarda mikotoksin varlığı ile ilgili konulara da ilgi artmaktadır (Esteban ve diğ., 2006). Gıda ve yemlerin üretim, depolama, satış veya tüketim basamakları ortam koşullarının küf gelişimi ve toksin oluşumu için uygun olması durumunda küfler gelişerek bunların mikotoksinlerle kirlenmesine neden olabilmektedir (Nizamlıoğlu ve Çon, 2010). Özellikle tarım ürünlerinde olan mikotoksin kontaminasyonu dünya çapında sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Kontamine gıdalardan mikotoksinlerin uzaklaştırılması için fiziksel ve kimyasal yöntemler üzerine araştırmalar devam etmektedir (Varga ve Kozakiewicz., 2002).

En önemli mikotoksinler olarak, *Aspergillus* türleri tarafından oluşturulan aflatoksinler, *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından oluşturulan OTA ve patulin, *Fusarium* cinsine bağlı küfler tarafından üretilen toksinler, örneğin deoxynivalenol, zearalenone, T-2 ve HT-2 toksinleri ve fumonisinler olarak kabul edilmektedir (Krska ve Molinelli, 2007).

Gıdalarda mikotoksin oluşumu için gerekli olan önemli faktörler: nem (substrat nemi, kurutmadaki hızlılık, bağıl nemi, sıcaklık, mekanik zararlanma gibi fiziksel faktörler; CO_2, O_2, substratın kimyasal yapısı, substrata yapılan kimyasal uygulamalar ve gübreleme gibi kimyasal faktörler ve inokulum yoğunluğu, bitki dayanıklılığı, küf türleri arasındaki genetik farklılık gibi biyolojik faktörlerdir. Besinlerin uygun olmasının yanında küf gelişimi ve mikotoksin üretimi için gerekli olan en önemli faktörler sıcaklık ve substrat nemidir (Erzurum, 2001).

Aspergillus spp.'nin mikotoksin üretimini etkileyen faktörleri ise iki başlık altında toplamak mümkündür. Fiziksel parametreler; spor üretimi, sıcaklık ve pH'dır.

Besinsel faktörler; karbon kaynağı, nitrojen kaynağıdır. Besinsel kaynaklar hem mikotoksin üretimini hem de morfolojik farklılaşmayı etkileyebilmektedir. Bunlara ek olarak, tohumda bulunan *Aspergillus* türleri tarafından enfekte edilmiş bazı bileşenler hem toksin üretimini hemde küf gelişimini etkileyebilmektedir (Calvo ve diğ., 2002).

Okratoksin A, *Aspergillus ochraceus, A. carbonarius, A. niger* ve *Penicillium verocosum*'un da dahil olduğu bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilmektedir. İnsan ve hayvanlar üzerine olan toksik etkileri nedeniyle okratoksin A'ya olan ilgi dünya çapında giderek artmaktadır (Duarte ve diğ., 2010). OTA'nın hedef organı böbrekler olarak bilinmektedir ve Balkan Endemik Nefropati (BEN) hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmalar OTA'nın nefrotoksik, hepatoksik, nörotoksik, teratojenik ve immunotoksik olabileceğini rapor etmişlerdir (Hassan ve diğ., 2010; Khoury ve Atoui, 2010).

Aspergillus section *Nigri* üyeleri OTA kontaminasyonundan başlıca sorumlu gruptur. Bu grup üyelerinden *A. carbonarius* özellikle üzümde yüksek seviyelerde okratoksin A üretmektedir (Magan ve Aldred, 2005; Kapetanakou ve diğ., 2010; Ouslati ve diğ., 2010; Spadaro ve diğ., 2010; Rossi ve diğ., 2012).

Bu çalışmada *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin gelişme ve OTA üretimine sıcaklığın etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kuru incirden izole edilmiş 30 adet *Aspergillus* section *Nigri* üyesi (*A. carbonarius* ve *A. niger* agg.) izolatın besiyerinde 25 ve 30°C'de okratoksin A oluşturma potansiyelleri ve okratoksijenik 3 adet *A. carbonarius* ve 1 adet *A. niger* izolatının gelişme ve okratoksin A üretim özellikleri 8 farklı sıcaklıkta incelenmiştir. Ayrıca bu kapsamda okratoksin A oluşumunun inkübasyon süresiyle değişimi araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Aspergillus* section *Nigri* Üyesi Küfler

Aspergillus cinsi küfler, dünya çapında en çok bilinen ve sıklıkla karşılaşılan küflerdir. Türleri ekonomik anlamda oldukça önemlidir (Pitt ve Hocking, 2009). Siyah *aspergilli* (siyah sporlu küfler) olarak bilinen *Aspergillus niger* grup ya da *Aspergillus* section *Nigri* üyeleri büyük ölçekli endüstriyel uygulamalar için kullanılmakta ve dünya çapında yayılış göstermektedir. Yararlı birçok ürünün eldesinde ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmalarının yanı sıra bu gruba ait küflerin birçoğunun okratoksin A (OTA) başta olmak üzere çeşitli toksinleri ürettikleri bildirilmiştir (Eltem ve Taşkın, 2005).

Endüstriyel önemlerine rağmen siyah aspergillilerin (*Aspergillus* section *Nigri*) taksonomisi net değildir (Abarca ve diğ., 2004). *Aspergillus* section *Nigri*'de birbirinden kolaylıkla ayrılabilen türlerin yanı sıra *A niger* aggregate (*A. niger* agg.) gibi birbirine oldukça benzer morfolojik özelliklere sahip üyeler de bulunmaktadır (Eltem ve Taşkın, 2005). *A.* section *Nigri* üyesi küflerin sınıflandırılması sürekli değişkenlik göstermektedir.

Mosseray (1934), ilk olarak 35 adet *Aspergillus* section *Nigri* üyesi küf türü tanımlamışken Raper ve Fennel (1965), tür sayısını 12'ye indirmiştir. 1980'li yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda *Aspergillus* section *Nigri* içinde *A. carbonarius, A. ellipticus, A. foetidus, A. heteromorphus, A. helicothrix, A. japonicus* ve *A. niger*'in yer aldığı bildirilmiştir. Daha sonra ki yıllarda yapılan taksonomik çalışmalar *A. niger* grubunu *A. niger* ve *A. tubigensis* olmak üzere iki başlık altında incelemiştir. Samson ve diğ. (2004) 'de moleküler teknikler kullanılarak yapılan sınıflandırmada *A.* section *Nigri* grubunun *Aspergillus costaricaensis, Aspergillus lacticoffeatus, Aspergillus sclerotioniger, A. vadensis*'in de dahil olduğu on beş türden oluştuğu bildirilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda Samson ve diğ., 2007'de belirtilen 19 türe (*A. aculeatus, A. brasiliensis, A. carbonarius, A. costaricaensis, A. ellipticus, A. foetidus, A. heteromorphus, A. homomorphus, A. ibericus, A. japonicus, A.*

lacticoffeatus, A. niger, A. piperis, A. sclerotiicarbonarius, A. sclerotioniger, A. tubingensis, A. uvarum, A. vadensis) ek olarak *Aspergillus eucalypticola, A. fijiensis, A. indologenus, A. neoniger* şeklinde dört yeni tür tanımlanmıştır (Varga ve diğ., 2011).

Aspergillus section *Nigri* üyelerinin, OTA üreticisi olduğu ilk defa Abarca ve diğ, (1994) tarafından bildirilmiş ve bu tarihten sonra bu konuda ki çalışmalar artmıştır. *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin siyah sporlarının güneş ve UV ışığına karşı dayanıklı olduğundan güneşte kurutulan meyvelerde hakim florayı oluşturdukları ve geniş bir sıcaklık aralığında gelişme gösterdikleri belirtilmiştir (Aish ve diğ., 2004).

Aspergillus section *Nigri* üyeleri dünya çapında gıda bozulmalarından sorumlu funguslar arasında kabul edilmektedir. Bazıları endüstriyel anlamda yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin ve gıdalarda yaygın olarak kullanılan organik asitlerin önemli kaynaklarındandır. *A. niger* suşları tarafından üretilen ürünler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından GRAS (Generally Recognized As Safe- Genel olarak güvenilir) olarak kabul edilmektedir.

Pitt ve Hocking (2009), tarafından *Aspergillus niger* için gelişme sıcaklıklarının minimum 6-8°C, maksimum 45-47°C ve optimum 35-37°C olduğu belirtilmiştir. *Aspergillus carbonarius*'un ise 10°C'de geliştiği ancak 7-8°C'de gelişmediği, optimum gelişmenin 30°C, maksimum gelişmenin 41°C'de olduğu ifade edilmiştir. Spadora ve diğ., (2010)'nin yaptıkları çalışmada da, *A. carbonarius* çalışılan tüm sıcaklık aralıklarında (15-35°C) gelişirken optimum gelişmeyi 30°C'de göstermiştir.

Arjantin'de üzümlerden elde edilen izolatlar içinde *A.* section *Nigri* üyelerinin dağılımı incelenmiştir. 538 adet *A.* section *Nigri*'nin incelenmesi sonucunda en yaygın türün *A. niger* agg. olduğu (2006-07 yılında %81 ve 2007-08 yılında %87), bunu 2006-07 yılında %12 ve 2007-2008 yılında %8 ile *A. carbonarius*'un izlediği saptanmıştır. *Aspergillus* uniseriate'in bulunma sıklığının ise diğerlerine göre daha az olduğu belirlenmiştir (2006 -2007'de %8 ve 2007-2008'de %6) (Chiotta ve diğ., 2010).

Okratoksin A üretici suşların incelendiği bir çalışmada *A. niger* agg. izolatlarının %1,4'ünün, *A. carbonarius* izolatlarının ise %72,6'sının okratoksijenik olduğu bulunmuştur (Varga ve diğ., 2005).

Belli ve diğ. (2004b), üzümlerden elde edilen izolatlarda *Aspergillus* section *Nigri* gelişimini 10-37^{0}C ve 0,90-0,995 a_w aralığında incelemişlerdir. Mikrobiyal gelişme koloni çapları ölçülerek belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, mikrobiyal gelişme için en uygun sıcaklığın 30-37°C ve su aktivitesinin de 0.98 olduğu saptanmıştır.

A. carbonarius'un gelişmesi su aktivitesine bağlı olarak da değişim göstermektedir. Küf gelişmesi 25 ve 30°C'de, 0,96-0,98 a_w aralığında su aktivitesi artışına bağlı olarak artmaktadır. 0,83 ve 0,87 a_w'de ise gelişmenin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Mitchell ve diğ., 2004; Belli ve diğ., 2007; Kapetanakou ve diğ., 2009; Spadora ve diğ., 2010). Literatürde *A. carbonarius*'un OTA üretimine daha sık rastlandığı belirtilmesine rağmen Iamanaka ve diğ. (2006) literatürden farklı sonuçlar rapor etmiştir. Çalışmada Türkiye, İspanya, Meksika, Tunus, Amerika ve Şili'den toplanan kuru meyve örneklerinden izole edilen okratoksijenik suşların %2,44'ünün *A. carbonarius* ve %97,6'sının da *A. niger* olduğunu belirtmiştir.

Aspergillus section *Nigri*'nin ürettiği başlıca toksin, okratoksinler olmasına rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar fumonisin B_2 ve B_4'ün de *A.* section *Nigri* üyesi olan *A. niger* tarafından üretildiğini bildirmektedir (Frisvad ve diğ., 2007; Noonim ve diğ., 2008; Mogensen ve diğ., 2009; Frisvad ve diğ., 2011; Logrieco ve diğ., 2011). Bunlara ek olarak fumonisin B_6 olarak isimlendirilen yeni bir fumonisin türevinin de *A. niger* tarafından üretildiği saptanmıştır (Frisvad ve diğ., 2007; Noonim ve diğ., 2009; Manssont ve diğ., 2010; Palencia ve diğ., 2010). Bu konuda yapılan çalışmalar gıdalardan çok hangi grup küflerin fumonisin ve okratoksin A'yı birlikte üretme potansiyeli olduğu üzerine yoğunlaşmıştır. Ürün olarak ise kahve çekirdeklerinde (Noonim ve diğ., 2009; Moslem ve diğ., 2010) ve üzümde (Chiotta ve diğ., 2011; Logrieco ve diğ., 2011) fumonisin ve okratoksin A üreticisi *A. niger* suşlarının varlığı rapor edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada 180 adet *Aspergillus niger* izolatının %8''inin fumonisin, %17'sinin OTA, %10'unun ise her iki mikotoksini de ürettiği saptanmıştır (Frisvad ve diğ., 2011b). *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin fumonisin üretimleri ile ilgili yapılan bir çalışmada Tayland'da yetiştirilen kahve çekirdeklerinden elde edilen izolatlar kullanılmıştır. Fumonisin B_2 üreticisi 2 küfün aynı zaman da okratoksin A ürettiği de bulunmuştur (Noonim ve diğ., 2009). Chiotta ve diğ. (2011), sadece *A. niger*'in OTA ve fumonisini birlikte üretebileceğinden bahsetmiştir. Bu kapsamda

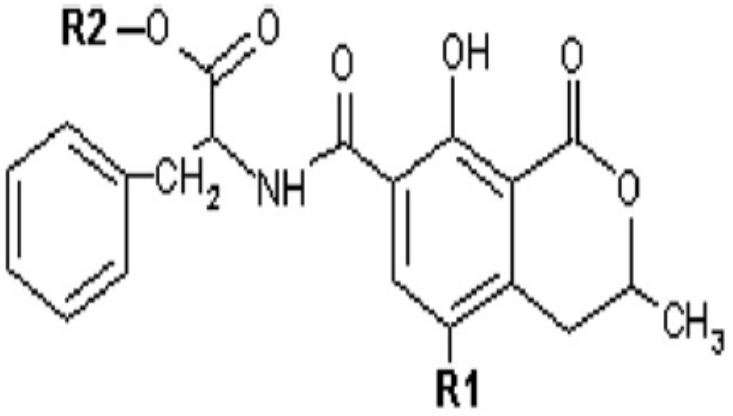
yaptıkları çalışmada Arjantin üzümlerinden izole edilen *A. niger*'in fumonisin üretme sıklığının (%35) OTA üretme sıklığına (%14) göre daha az olduğunu belitmişlerdir.

Toksin üretimlerinin yanı sıra *A.* section *Nigri* üyeleri biyolojik olarak aktif birçok bileşik üretmektedir. Bunlar arsında en önemlilerinden biri de penisilik asittir, bu bileşik biyolojik olarak aktif olmasının yanı sıra diğer birçok özelliği ile de önem kazanmaktadır. Penisilik asit asıl olarak *A. ochraceus* grubu tarafından üretilmekle birlikte çoğukez okratoksijenik *A.* section *Nigri* üyeleri tarafından üretilmektedir. Penisilik asitin okraroksin A ile sinerjik etkisinin olduğu belirtilmektedir. Penisilik asit son zamanlarda algılama inhibitörü olarakta kullanılmaktadır. Penisilik asitten bir bakteri inhibitörü olması ve antibiyotik özellik göstermesi gibi özelliklerinden dolayı birçok farmakolojik uygulamada yararlanılmaktadır (Palnecia ve diğ., 2010).

Biyokumarin (biocoumarin) 'de *A. niger* izolatlarından elde edilen bir birleşiktir. Çok karakteristik absopsiyon profilleri olması sebebiyle *A. niger* grubun diğer izolatlarında ayrılmasında önemli bir göreve sahiptirler. *A. niger*'in ise ticari kullanımı oldukça yaygındır. Sitrik asit üretimi nedeniyle gıda, kozmetik ve farmakolojik alanlarda yararlanılır. Bunlara ek olarak 1960'dan beri gıda sanayiinde kullanılan α-amilazlar, selülazlar ve pektinazlar gib endüstriyel enzimlerinde üretilmesinde *A. niger* önemli bir kaynaktır. *A.niger*'in endüstriyel koşullarda toksik olmadığı kabul edilmektedir (Neilsen ve diğ., 2009).

2.2 Okratoksin A

Okratoksin A ilk olarak 1965 yılında *Aspergillus ochraeus*'un bir metaboliti olarak tanımlanmıştır (Belli ve diğ., 2004a; Zinedine ve diğ., 2007). Okratoksin A üreticisi küfler okratoksin A türevlerini de üretebilmektedir; okratoksin B (OTB), okratoksin C (OTC), Metil okratoksin A (MeOTA), ve OTB metil ve etil esterleri (MeOTB ve EtOTB) 'dir. OTA ve OTA türevlerinin kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Birçok OTA türevi olduğu bilinmesine rağmen en yagın olan olan okratoksin A'dır (Belli ve diğ., 2002). Okratoksin türevleri ile ilgili yapılan bir çalışmada tüketicilerin şarap tüketimi sonucunda okratoksin A ve toplam okratoksine maruz kalma miktarları tahmin edilmiştir. Okratoksin A'ya maruz kalma düzeyinin, toplam okratoksine maruz kalma düzeyinin %50'den fazlasını oluşturduğu saptanmıştır (Remiro ve diğ., 2012).



Okratoksin	R_1	R_2
OTA	Cl	H
MeOTA	Cl	CH_3
OTC	Cl	CH_3 CH_2
OTB	H	H
MEOTB	H	CH_3
EtOTB	H	CH_3 CH_2

Şekil 2.1 : Okratoksin türevlerinin kimyasal yapısı (Remiro ve diğ., 2012).

Daha önce yapılan çalışmalarda OTA'nın sadece *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus* section *Circumdati* üyeleri ve *Penicillium verrucosum* tarafından üretildiği bilinmekteydi. *Aspergillus carbonarius*'un OTA üretici olarak belirlenmesinin ardından, literatür çalışmalarında şarap, üzüm, kuru meyvelerde ve kahvede asıl OTA kaynağının *A. carbonarius* olduğu belirlenmiştir (Esteban ve diğ., 2006).

Aspergillus carbonarius yüksek miktarlarda OTA üretirken, *A. niger* düşük düzeylerde ve %6-10 aralığında OTA üretim kapasitesine sahiptir. Bir diğer OTA üretici küf *A.* section *Nigri* üyesi *A. sclerotioniger*'dir. Ancak bu küfün varlığına sadece kahvede rastlanmıştır. Bu küfler arasında en yaygın rastlanan tür *A. niger*'dir. (Nielsen ve diğ., 2009).

Okratoksijenik küflerin dağılımı ve son üründe ki OTA miktarı iklimsel faktörlerden etkilenmektedir. Bu açıdan ürünlerin okratoksin A miktarı ürünün orijiniyle ilişkilendirilmektedir (Covarelli, 2012). OTA üreticisi küflerin hammaddede bulunması potansiyel OTA üretimini işaret etmektedir. Erken aşamalarda OTA üreticisi küflerin belirlenmesi, OTA üretiminin engellenmesi açısından önem kazanmaktadır. Okratoksin A'nın kısmen kararlı bir bileşik olması sebebiyle

haşlama, fırınlama, kızartma, fermantasyon vs. gibi çeşitli gıda işleme yöntemleri sonucunda düşük miktarlarda kaybolduğu düşünülmektedir. OTA parçalanması pH, sıcaklık ve diğer parametrelerinde etkisi altında gerçekleşmektedir (Hayat ve diğ., 2012).

Okratoksin A, 1990'lı yıllarda şarapta ilk olarak tespit edilen nefrotoksik bir bileşiktir (Varga ve Kozakiewicz, 2006). OTA sindirim sisteminden absorbe edilmekte ve kan yoluyla, başlıca böbreklerde, düşük konsantrasyonlarda karaciğerde, kas ve yağ dokuda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, OTA'nın fare, tavşan ve insan sütüne geçtiği gözlenirken, geviş getiren hayvanlarda OTA'nın süte geçme miktarının çok az olduğu belirlenmiştir (Creppy, 2002). Hayvan yemlerine OTA bulaşması, kanda ve yenilebilir sakatatta OTA varlığına neden olabilirken, ete süte ve yumurtaya OTA bulaşması ihmal edilebilir düzeydedir (EFSA, 2006).

Okratoksin A'nın beynin bütün bölgelerinde DNA'ya zarar verdiğinin tespitinin ardından okratoksin A'nın alzheimer, parkinson ve sinir sistemi hastalıklarına sebep olup olmadığı konusunda ki çalışmalar hız kazanmıştır (Sava ve diğ., 2006). Bunların yanında okratoksin A toksikasyonunda kan pıhtılaşma bozukluğu, iskelet yapısında değişiklik, anemi, glikoz sentezinde azalma, lökositer fagositoz da azalma ve serum parametrelerinde (plazma protein, üre, kolesterol, trigliserit) değişiklik olduğu, yüksek kreatinin ve ürik asit seviyesleri gözlendiği bildirilmiştir (Yıldız, 2009).

2.2.1 Okratoksin A üreticisi küfler

Okratoksin A ilk olarak *Aspergillus ochraceus*'un metaboliti olarak, güneşte kurutulan tahıl, fındık ve meyvelerde tanımlanmıştır. *A. ochraceus* ve ilişkili türlere çok çeşitli kurutulmuş gıdalarda yaygın olarak rastlanmaktadır (Pitt, 2000; Pardo, 2004; Mitchell, 2004).

A. ochraceus dışında *Penicillium verrucosum* ve başta *Aspergillus carbonarius* olmak üzere siyah aspergilli üyelerinin OTA üreticisi olduğu bilinmektedir. *P. verrucosum* ılıman bölgelerde ki hububatlarda baskındır. Kuzey Avrupa'da arpa ve buğdayda, Almanya ve diğer Avrupa ülkelerinde et ve et ürünlerinden sıklıkla izole edilmiştir (Pitt, 2000; De Rossi ve diğ., 2012).

Gıdalarda yaygın olarak bulunan *Aspergillus niger* düşük seviyede ve sıklıkta okratoksin A üretmektedir. Ancak *Aspergillus* section *Nigri* üyesi *Aspergillus*

carbonarius'un *A. niger*'e oranla daha yüksek miktarda ve sıklıkta OTA üreticisi olduğu bildirilmiştir. Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus* section *Nigri* üyeleri ve ürettikleri OTA miktarları Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

A. carbonarius ve *A. niger* tropik bölgelerde yetişen ve güneşte kurutulan gıdalarda oldukça yaygındırlar. Kurutulmuş asma meyvelerinde, şarapta ve ayrıca kahvede *A.carbonarius* önemli bir okratoksin A kaynağıdır (Pitt, 2000). *A.* section *Nigri* üyelerinden, *A. carbonarius* ve *A. niger*'e ek olarak *A. sclerotioniger*'de OTA üretmektedir ancak bu küfe sadece kahvede rastlanmıştır ve yaygın değildir (Neilsen ve diğ., 2009).

Yapılan bir çalışmada bu gruba ait izolatların %61,36'sının 0,1-12,168 ng/g aralığında OTA ürettiği belirtilmiştir. Maksimum OTA'yı ise *A. carbonarius* 30°C'de üretmiştir (Techarat ve diğ., 2012). *A. carbonarius* diğer siyah aspergillilerden büyük konidyaları nedeniyle kolayca ayrılabilmektedir. Baharatlarda %98-100 oranında OTA ürettikleri bilinmektedir. Optimum 32-35°C ve 0,90-0,99 su aktivitesinde gelişirken, OTA üretimi için optimum koşullar 20-25°C ve 0,95-0,98 a_w'dir (Belli ve diğ., 2005; Visconti ve diğ, 2008). *A.niger* agg. optimum 35-37°C ve 0,93-0,98 a_w'de gelişmektedir. OTA üretim ise 20-25°C ile 0,95-0,98 aralığındadır (Esteban ve diğ., 2004; Visconti ve diğ, 2008). Bu gruba dahil küflerin oldukça sınırlı düzeylerde OTA üreticisi oldukları (%5-10) ancak gıdalarda oldukça yaygın olmaları sebeiyle önem kazandıkları rapor edilmektedir.

Heperkan ve diğ. (2012), yaptıkları çalışmada 115 kuru incir örneğinin %65,2 oranında *A. niger agg.*'le %21,7'sinin de *A. carbonarius*'la kontamine olduğu bulunmuştur. *A. niger* agg. izolatları %47 oranında OTA üretirken, *A. carbonarius* izolatları %88 oranında OTA üretmiştir. *A. carbonarius, A. niger* izolatlarına oranla yüksek düzeylerde okratoksin A üretmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada ise kuru meyvelerde OTA üreticisi küflerin varlığı 119 örnekte araştırılmıştır. *A. carbonarius* ve *A. niger* varlığına incir, hurma, erik, beyaz-siyah üzüm örneklerinde sırasıyla %4,5 %8,6, %8, %0,5 ve %22 oranında rastlanmıştır. *A. ochraceus* varlığı ise sadece siyah üzüm, hurma ve erik örneklerinde %0,5-%1,1 aralığında belirlenmiştir (Iamanaka ve diğ., 2006).

Çizelge 2.1 : Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus* section *Nigri* üyesi *A. carbonarius* ve *A. niger*'in ürettikleri OTA miktarları.

Ürün çeşidi	İzole edilen küf	OTA miktarı (µg/kg)	Kaynaklar
A. carbonarius	Kakao tanesi	9,14-3520	Amezquate ve diğ., 2008
A. carbonarius	Üzüm	54,7-166,3	Favilla ve diğ., 2008
A. carbonarius	Buğday	10-9350	Riba ve diğ., 2008
A. carbonarius	Üzüm	988-2960	Kapetanakou ve diğ., 2009
A. carbonarius	Kakao	*	Copetti ve diğ., 2010
A. carbonarius	Antep fıstığı	1200	Fernane ve diğ., 2010
A. carbonarius	Kahve çekirdeği	820- 1900	Moslem ve diğ., 2010
A. carbonarius	Üzüm	20-8090	Oueslati ve diğ., 2010
A. carbonarius	Üzüm	180- 1950	Spadora ve diğ., 2010
A. carbonarius	Mısır tanesi	61-2416	Alborch ve diğ., 2011
A. carbonarius	Üzüm	50-6700	Palumbo ve diğ., 2011
A. carbonarius	Üzüm suyu	3700-7100	Var ve diğ., 2011
A. carbonarius	Şaraplık üzüm	9,275-12,168	Techarat ve Dachoupakan, 2012
A. carbonarius ve *A. niger*	Kahve çekirdeği	<0.6–5,5 (Arabica)	Frisvad ve diğ., 2008
A. carbonarius ve *A. niger*	Kahve çekirdeği	1–27 (Robusta)	Frisvad ve diğ., 2008
A. carbonarius ve *A. niger*	Kahve	*	Noonim ve diğ., 2008
A. niger	Zedeli mısır	1- 3,2	Martins ve diğ., 2005
A. niger	Üzüm	40-530	Lasram ve diğ., 2007
A.niger	Buğday	10-30	Riba ve diğ., 2008
A. niger	Kakao	*	Copetti ve diğ., 2010
A. niger	Antep fıstığı	300-1200	Fernane ve diğ., 2010
A. niger	Kahve çekirdeği	200-2120	Moslem ve diğ., 2010
A. niger	Mısır tanesi	61-576	Alborch ve diğ., 2011
A. niger agg.	Üzüm	0,1-37,12	Techarat ve Dachoupakan, 2012

* : Değer belirtilmemiştir.

2.2.2 Okratoksin A üretimini etkileyen faktörler

OTA üretimi de mikotoksin üretimine benzer şekilde sıcaklık, su aktivitesi, substrat kompozisyonu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Esteban ve diğ. 2006; Romero ve diğ, 2007; Gaina ve diğ, 2009).

Aspergillus carbonarius 5-45°C aralığında OTA üretirken, optimum OTA üretimi 15-30°C'dedir. OTA üretimi açısından gerekli su aktivitesi 0,87-0,99 aralığında iken optimum üretim 10-15 gün aralığında gerçekleşmektedir. *A. ochraceus* ise 5-40°C, 0,87-0,99 a_w aralığında OTA üretmektedir. OTA üretimi için optimum sıcaklık 20-35°C, optimum su aktivitesi 0,95-0,99'dir. *A. ochraceus* OTA üretimini 9-21 gün aralığında gerçekleştirmektedir. Diğer bir OTA üreticisi *A. niger* ise daha dar bir aralıkta OTA üretimi yapabilmektedir. OTA üretimi optimum 13-35°C, 0,95-0,99 a_w ve 5-30 gün aralığında gerçekleşmektedir. *P. verrucosum* OTA üretimini optimum 24-25°C, 0,95-0,99 a_w'de ve 14 günden daha fazla bir sürede gerçekleştirmektedir (Amezqueta ve diğ., 2012).

Okratoksin A üretimini etkileyen faktörlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar genel olarak okratoksin A üretimi üzerine sıcaklık ve su aktivitesinin etkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Altı farklı *Aspergillus carbonarius* izolatında su aktivitesinin OTA üretimi üzerine etkisi Esteban ve diğ.'leri tarafından 2005 yılında incelenmiştir. OTA oluşumu 15 ve 30°C olarak iki farklı sıcaklık ve 0,78-0,99 aralığında ki su aktivitesi değerlerinde Czapek yeast extract agar (CYA) ve yeast extract sucrose (YES) besiyerinde araştırılmıştır. *A. carbonarius* izolatlarının CYA besiyerinde daha fazla miktarda OTA ürettiği ifade edilmiştir. 15°C'de ki OTA konsantrasyonu 30°C'ye göre daha fazladır ve 15°C'de, gelişme ve OTA üretimi sadece 0,94-0,99 su aktivitesi aralığında tespit edilmiştir.

275 üzüm örneğinden izole edilen *A.* section *Nigri* üyesinin CYA besiyerinde OTA üretimleri iki farklı üzüm sezonu için değerlendirilmiştir. 2006/2007 sezonunda izolatların %32 oranında OTA ürettiği (0,5-1,285 µg/g) bildirilmiştir. OTA üreticisi suşların %69'u *A. niger* agg., %31'i ise *A. carbonarius*'tur. 2007/2008 sezonunda ise izolatların %19'u oktatoksijeniktir (0,5-7583 µg/g). Okratoksijenik suşların %55'i *A. niger* agg. iken %4''i *A. carbonarius*'tur (Chiotta ve diğ., 2010).

Bir başka çalışmada, *Aspergillus* section *Nigri*'nin (18 izolat), 5-45°C (9 farklı sıcaklıkta) gelişmeleri ve OTA üretimleri CYA ve YES besiyerinde incelenmiştir.

Aspergillus niger için maksimum OTA seviyeleri 20-25°C'de YES besiyerinde elde edilmiştir. *Aspergillus carbonarius* izolatları için maksimum OTA üretimi CYA ortamında ve 15 veya 20°C'de gerçekleşmiştir (Esteban ve diğ., 2004).

İki *Aspergillus carbonarius* izolatının sentetik üzüm besiyerinde (SNM) gelişme ve OTA üretimlerine sıcaklık ve su aktivitesinin etkisi Tassou ve diğ. (2009) tarafından incelenmiştir. Çalışma 0,85, 0,88, 0,90, 0,92, 0,94, 0,96 ve 0,98 su aktivitesinde ve 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C'de gerçekleştirilmiştir. İzolatlar SNM besiyerinde 25°C'de 10 gün inkübe edilmiştir. İzolatların 10°C'de tüm su aktivitesi değerlerinde gelişmediği 40^0C'de ise sadece 0.98 a_w'de geliştiği görülmüştür. İnkübasyon süresi arttıkça gelişim yüksek sıcaklık seviyelerinde (25-30°C), aksine OTA üretimi daha düşük sıcaklık seviyelerinde (15-20°C) gözlenmiştir.

Tunus üzümlerinden izole edilen okratoksijenik *Aspergillus carbonarius*'un gelişme ve OTA üretiminin incelendiği bir diğer çalışma Lasram ve diğ. (2010)'leri tarafından SNM besiyerinde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresince koloni çapı ölçülmüştür. İzolatların OTA üretme özellikleri ise 5. ve 10. günde incelenmiştir. Çalışmada gelişme ve OTA üretimi için en uygun su aktivitesi değerinin 0,99 olduğu bulunurken, sıcaklık derecesinin değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Optimum OTA üretiminin 15-20°C'de olduğu bununla beraber önemli miktarda toksinin ilk 5 günlük inkübasyon süresi sonunda üretildiği saptanmıştır.

Bragulat ve diğ. (2001), tarafından yapılan bir çalışmada okratoksijenik küflerin belirlenmesinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisine (HPLC) dayalı basit bir analiz yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. İki farklı kültür ortamının (YES ve CYA) ve sürenin *Aspergillus carbonarius*'un OTA üretimine ve üç farklı ekstraksiyon çözgeninin (metanol, metilen klorit/formik asit ve methanol/formik asit) OTA geri kazanımına etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda OTA üretimi için 7 gün inkübasyonun yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. *A. cabonarius* küfünün CYA'da YES'e göre daha fazla miktarda OTA ürettiği, geri kazanımın yüksek olması ve evaporasyon gerektirmemesi nedeniyle metanolün uygun olduğu ifade edilmiştir.

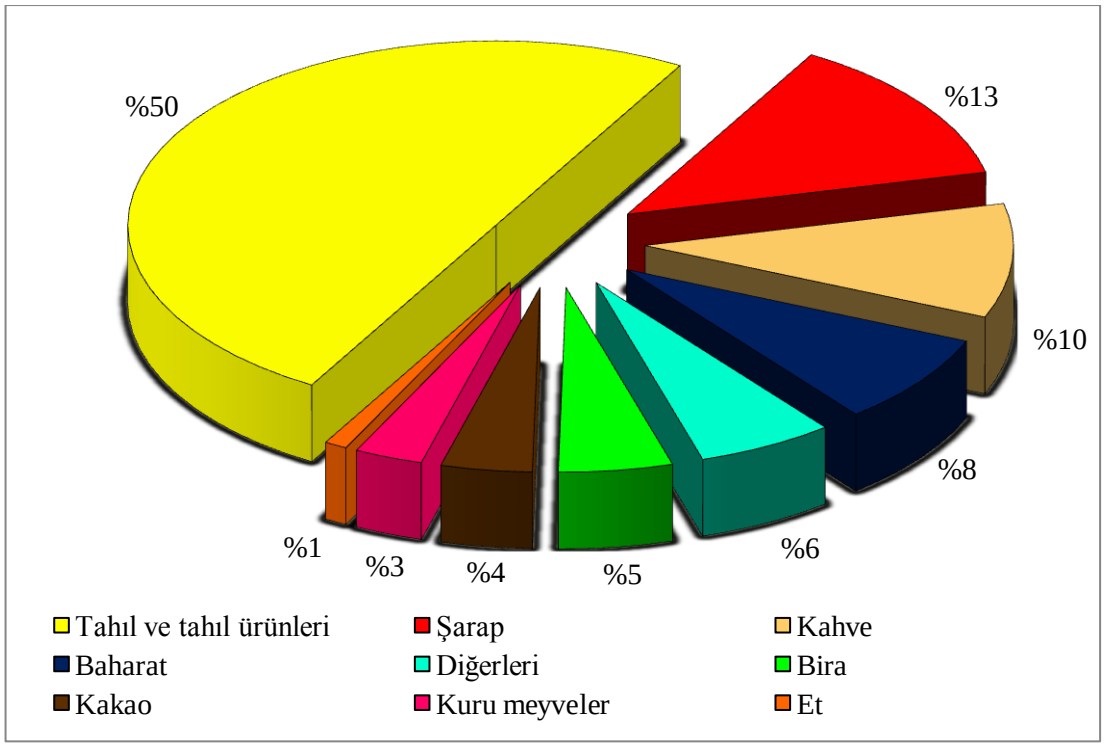
2.2.3 Gıdalarda OTA varlığı

OTA özellikle tahılların büyük kısmının üretilip depolandığı ılıman bölgelerde yaygındır. OTA üreticisi pek çok küfün varlığı nedeni ile farklı gıda ve yemlerde

OTA kontaminasyonu saptanmıştır. OTA üretimine neden olan küf türü ise bölgeden bölgeye değişiklik göstermektedir (Battilani ve diğ., 2004b).

OTA varlığı hububat ürünlerinde (Pardo ve diğ., 2004; Astoreca ve diğ., 2007; Alborch ve diğ., 2011), kahvede (Palecioz- Cabrera ve diğ., 2005; Pardo ve diğ., 2005; Esteban ve diğ., 2006), üzümde (Battilani ve diğ., 2004a; Pardo ve diğ., 2005; Belli ve diğ., 2006; Astoreca ve diğ., 2007; Romero ve diğ., 2007, Kapetenaoku ve diğ., 2009; Lasram ve diğ, 2010; Romero ve diğ., 2010; Patharajan ve diğ., 2011), kakao tanesinde (Amezqueta ve diğ., 2008; Copetti ve diğ., 2010), tütsülenmiş kırmızı biberde (Gill- Serna ve diğ., 2011) ve antep fıstığında (Fernane ve diğ., 2010) rapor edilmiştir.

Avrupa'da yapılan bir çalışmada günlük OTA alımına katkıda bulunan gıdalar araştırılmıştır. Şekil 2.2'den görüldüğü üzere insan beslenmesinde OTA'nın asıl kaynağı tahıllar olmakla birlikte bunu başlıca şarap, kahve ve baharatlar izlemektedir (SCOOP, 2002). Benzer olarak, Gıda Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Teşkilatının Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA), tarafından yapılan risk değerlendirmesine göre de, tahıl ve tahıl ürünleri OTA alımına %50'den fazla katkı sağlamaktadır, bu miktarı şarap, üzüm suyu ve kahve takip etmektedir (Visconti ve De Girolamo, 2005).



Şekil 2.2 : Avrupa'da günlük OTA alımına katkıda bulunan gıdalar (SCOOP,2002).

Okratoksin A mısır, arpa, buğday, çavdar, sorgum ve yulaf gibi hububatlarda doğal olarak oluşmaktadır. Soya, kahve ve kakao tanelerinde, fıstıkta, şarapta ve birada, baharatlarda, incirde ve dumanlanmış etlerde de OTA varlığına rastlanmıştır (Wood ve diğ., 2003; Techarat ve Dachoupakan, 2012).

Üzümlerden şarap yapımına kadar geçen süreçlerde okratoksin A'nın kaynağı başta *Aspergillus carbonarius* ve *A. niger* olmak üzere siyah aspergillilerdir (Visconti ve diğ., 2008). Tarımsal ürünler yanında hayvansal ürünlerde de okratoksin A varlığına rastlamak mümkündür. Bu kapsamda özellikle domuz orijinli et ürünleri ve kümes hayvanlarında rastlanmıştır (Veldman, 2004). Çiğ hayvansal ürünlerin yanı sıra süt, peynir, sosis, jambon ve pastırma gibi proses edilmiş ürünlerde de OTA varlığına rastlamak mümkündür (Gonzales-Osyana ve diğ., 2008).

2.2.4 Sağlık üzerine etkileri

İnsanlar mikotoksinlerle kontamine olmuş gıdaların veya bunlarla beslenen hayvanların ürünlerinin tüketilmesiyle mikotoksinlere maruz kalmaktadır. Sporların solunması ile de mikotoksinlere maruz kalınmaktadır. OTA, temel olarak böbrekleri etkilemektedir. OTA'nın bağışıklık sistemini baskılayıcı (immünosüpresif), hepatonefrotoksik, teratojenik, genotoksik ve lipit peroksidasyonu (LPO) artırıcı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Atasayar-Sabuncuoğlu ve diğ., 2008; Giray ve diğ., 2011).

Okratoksin A'nın insan ve hayvan sağlığı açısından yarattığı riskin, özellikle kanserojen ve genotoksik etkilerinin ortaya konması ile giderek daha önem kazandığı bilinmektedir (Aksoy ve diğ., 2003). OTA'nın temel toksik etki mekanizması, ATP azalmasına bağlı olarak mitokondriyel solunumun inhibisyonu, protein sentezinin azalmasına eşlik eden tRNA sentezinin inhibisyonu şeklinde rapor edilmiştir (Atasayar-Sabuncuoğlu ve diğ., 2008).

Okratoksin A'nın toksik etkileri üzerinde çalışmalar yaygın olarak çeşitli deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilmektedir. Üzerinde çalışılan bütün hayvanlar ağızdan okratoksin A alınmasına farklı derecede duyarlılık gösterdiği saptanmıştır. Yüksek seviyede okratoksin A alınmasıyla böbreklerde, diğer organlarda ve dokularda değişiklikler gözlenmiştir, fakat bu toksine çevrede bulunduğu derecede maruz kalınması sadece böbrek dokularında bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir (ECH, 2012).

Okratoksin A kontaminasyonuna maruz kalan yemlerle beslenen hayvanlarda OTA'nın organlara, kana ve yumurtaya geçtiği saptanmıştır. Düşük miktalarda OTA alınması halinde, yumurtada bu toksine rastlanmadığı ancak yüksek miktarlarda alımlarda rastlandığı belirlenmiştir. İnsanda okratoksin A'ya maruz kalma miktarı ise kan, idrar örnekleri ve anne sütünde ki OTA seviyelerinin belirlenmesi ile tahmin edilmektedir (Aish ve diğ., 2004).

OTA, nefrotoksik teratojenik, immunotoksik ve nörotoksik özelliklere sahiptir. İnsanlarda Balkan Endemik Nefropati adı verilen bir hastalıkla ilişkili olduğu ve uzun bir yarılanma ömrüne sahip olduğu bilinmektedir (Lobeau ve diğ., 2005). BEN, böbreklerde nefropatiye sebep olan, öncelikli olarak kadınlarda etkili, yavaş seyirli, ölümcül ve kronik bir hastalıktır. Özellikle 40 yaşın üzerindekilerde etkili olmaktadır. Erken yaşlarda ise 10-19 yaşlarında görülmekle birlikte daha çok 50'li yaşların başlarındakilerde tespit edilmiştir (Şeviktürk ve Gönülalan, 2007).

Okratoksin A'nın gözlenen en çarpıcı etkilerinden birinin de protein sentezini engellemek olduğu yapılan invivo ve invitro çalışmalarla belirlenmiştir (Pohland ve dig., 1992). Aynı zamanda OTA, dünyanın farklı bölgelerinde, idrar yolu tümörlerinin ve böbrek hastalıklarının gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Esteban ve diğ., 2006).

OTA, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından "Grup IIB" muhtemel karsinojen olarak sınıflandırılmıştır. OTA dolaylı karsinojen mekanizması aracılığıyla epigenetik karsinojen olarak da adlandırılmaktadır. Ancak aynı zamanda DNA'ya doğrudan bağlanabilmesi nedeniyle doğrudan karsinojen olarak kabul edilmektedir (IARC, 1993).

Okratoksin B'nin, okratoksin A'dan daha az toksik olduğu bu nedenle de karaciğer hücrelerinde protein biyosentezini inhibe etmediği bilinmektedir. OTA'nın daha toksik olmasına neden olarak da dihidro-metil-izokumarin halka sistemindeki beşinci karbon atomu üzerinde bulunan klor atomuna fenolik-OH eklenmesi ile toksisitenin arttığı bildirilmektedir. Okratoksin B'de klor atomunun bulunmaması daha az toksik olmasını sağlamaktadır. Okratoksinlerin kimyasal yapılarını olusturan fenilalanin ve dihidroizokumarin bilesiklerinin, amid bağı ile birbirlerine bağlanmaları ısıya ve hidrolize karşı kararlı bir yapı kazandırır (Petzinger ve Ziegler, 2000).

2.2.5 Yasal düzenlemeler

Gıda ürünlerinde izin verilen OTA limitleri birçok ülkede tebliğlerle belirlenmiştir, bu nedenle OTA'nın tespiti için güvenilir ve hassas metotlar gereklidir (Scott, 2002).

Avrupa Birliği'nin sağlık açısından risk oluşturan mikotoksinlerle ilgili yaklaşımı teknolojik olarak mümkün olan en düşük düzeyde toksin içeren ürünün tüketiciye ulaştırılması şeklindedir. Türkiye'de mikotoksinlerle ilgili yasal düzenlemeler Türk Gıda Kodeksi tarafından Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ ile belirlenmiştir. Çizelge 2.2'de Avrupa Birliği ve Türkiye'de okratoksin A ile ilgili yasal düzenlemeler gösterilmiştir (EC, 2006; EC, 2010; TGK, 2011).

Çizelge 2.2 : Türkiye ve Avrupa Birliği'nde gıdalarda bulunmasına izin verilen OTA limitleri.

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)	
	(TÜRKİYE)[1]	(AVRUPA BİRLİĞİ)[2]
İşlenmemiş tahıllar	5,0	5,0
Tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan tüketime sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3,0	3,0
Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm dahil)	10,0	10,0
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,0	5,0
Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ve ekstraktı	10,0	10,0
Şarap (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az % 15 olan şaraplar hariç) ve meyve şarapları	2,0	2,0
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli	2,0	-
Üzüm suyu, üzüm suyu konsantresi, üzüm nektarı ile doğrudan tüketime sunulan üzüm şırası ve üzüm şırası konsantresi	2,0	2,0
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,5	0,5
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,5	0,5

Çizelge 2.2 : Türkiye ve Avrupa Birliği'nde gıdalarda bulunmasına izin verilen OTA limitleri (devam).

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)	
	(TÜRKİYE)[1]	(AVRUPA BİRLİĞİ)[2]
Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	10,0	-
Baharatın aşağıdaki türleri için; — Kırmızıbiber (*Capsicum* spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) — Karabiber *(Piper* spp.) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) — Hintcevizi/Muskat (*Myristica fragrans*) — Zencefil (*Zingiber officinale)* — Zerdeçal (*Curcuma longa)*	30,0 (30.06.2012 tarihine kadar) 15,0 (1.07.2012 tarihinden sonra)	30,0* (30.06.2012 tarihine kadar) 15,0* (1.07.2012 tarihinden sonra)
Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	20,0	20,0*
Meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra, G. inflate* ve diğer türler)	80,0	80,0*
Meyan kökü (bitkisel infüsyon bileşeni olarak kullanılanlar)		
Meyan kökü ekstraktı (özellikle alkolsüz içcek ve şekerleme üretiminde kullanılan)		

[1]: Türk Gıda Kodeksi, 2011
[2]: EuropanCommission, 2006
*: EuropanCommission, 2010

WHO ve FAO'nun Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) 1995'te 44. toplantısında OTA konusunda yapılan değerlendirmede, tolere edilebilir haftalık OTA miktarını 0,1 µg/kg vücut ağırlığı (14 ng/kg vücut ağırlığı/gün'e eşittir) olarak belirlenmiştir (Anonim, 1995).

TDI (Tolerated daily intake-tolere edilebilir günlük alım miktarı), mevcut bilimsel verilere göre bir ömür boyu sağlıklı yaşam için kayda değer bir zarar vermeden, günlük tüketilebilir madde miktarı olarak tanımlanmaktadır. Okratoksin A'ya maruz kalma miktarını mümkün olduğunca azaltmak ve tolere edilebilir günlük alım miktarın günde 5 ng/ kg vücut ağırlığı seviyesine ayarlamanın korunma açısından bir tedbir olacağı düşünülmektedir (Anonim, 2002).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

3.1.1 *Aspergillus* section *Nigri* izolatları

Tez çalışması kapsamında Ege Bölgesi'nden toplanan kuru incirlerden izole edilen 30 adet *Aspergillus* section *Nigri* izolatı (10 adet *A. carbonarius*, 20 adet *A. niger* aggregate) kullanılmıştır (Karbancıoğlu-Güler, 2008). Çalışmada kullanılan izolatlar ve okratoksin A oluşturma özellklerinin incelendiği besiyerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : *Aspergillus* section *Nigri* üyesi izolatlar ve okratoksin A üretim özellklerinin incelendiği besiyeri.

No	İzolat kodu	Tür	Besiyeri	No	İzolat kodu	Tür	Besiyeri
1	9Y1	*A. carbonarius*	CYA[1]	16	15D2	*A. niger* agg.	YES
2	46D2	*A. carbonarius*	CYA	17	16X2	*A. niger agg.*	YES
3	57D1	*A. carbonarius*	CYA	18	16M2	*A. niger agg.*	YES
4	65D9	*A. carbonarius*	CYA	19	17D6	*A. niger* agg.	YES
5	1-04D1	*A. carbonarius*	CYA	20	18M5	*A. niger* agg.	YES
6	8-04D2	*A. carbonarius*	CYA	21	23D1	*A. niger* agg.	YES
7	9-04D1	*A. carbonarius*	CYA	22	24X2	*A. niger* agg.	YES
8	20-04X2	*A. carbonarius*	CYA	23	25D2	*A. niger* agg.	YES
9	21-04D1	*A. carbonarius*	CYA	24	27D2	*A. niger* agg.	YES
10	39-04X4	*A. carbonarius*	CYA	25	28X1	*A. niger* agg.	YES
11	6Y1	*A. niger agg.*	YES[2]	26	31D2	*A. niger* agg.	YES
12	8D3	*A. niger agg.*	YES	27	57M2	*A. niger* agg.	YES
13	9D4	*A. niger agg.*	YES	28	8-04X2	*A. niger* agg.	YES
14	12D7	*A. niger* agg.	YES	29	27-04D1	*A. niger* agg.	YES
15	14D5	*A. niger* agg.	YES	30	44-04X1	*A. niger* agg.	YES

[1]: Czapek Yeast Ekstract Agar.
[2]: Yeast Ekstrakt Agar.

3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler

Küf süspansiyonlarının hazırlanmasında malt ekstrakt agar (MEA-Merck 1,05398) ve %0,5'lik Tween 80 çözeltisi kullanılmıştır. İzolatlar CYA (Czapek yeast ekstrakt agar) ve YES (yeast ekstrakt sucrose) besiyerine inokule edilmiş ve analizler gerçekleştirilmiştir. Kullanılan besiyeri ve izolat bileşimleri Çizelge 3.1'de çözeltilerin kimyasal bileşimine ait formüller ise Çizelge. 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7'de gösterilmiştir. Besiyeri ve Tween 80 çözeltisi 121°C-15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Çizelge 3.2 : CYA besiyeri kimyasal bileşimi.

Czapek Yeast Agar	Miktar
Dipotasyum hidrojen fosfat	1 g
Czapek çözeltisi	10 mL
İz metal çözeltisi	1 mL
Maya ekstraktı (toz)	5 g
Sukroz	30 g
Agar	15 g
Distile su	1L

Çizelge 3.3 : İz metal çözeltisi kimyasal bileşimi.

İz metal çözeltisi	Miktar
$CuSO_4.7H_2O$	0,5 g
$ZnSO_4.7H_2O$	1 g
Distile su	100 mL

Çizelge 3.4 : Czapek çözeltisi kimyasal bileşimi.

Czapek çözeltisi	Miktar
NaNO3	30 g
KCl	5 g
MgSO4.7H2O	5 g
FeSO4.7H2O	0,1 L
Distile su	100mL

Çizelge 3.5 : YES besiyeri kimyasal bileşimi.

İz metal çözeltisi	Miktar
Yeast ekstrakt	20g
Sukroz	150 g
Agar	20 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g
Distile su	100 mL

Çizelge 3.6 : Malt ekstrakt agar besiyeri kimyasal bileşimi.

Malt ekstrakt agar	Miktar
Malt ekstrakt	30g
Pepton	3 g
Agar	15 g
Distile su	1 L

Çizelge 3.7 : Tween 80 çözeltisinin kimyasal bileşimi.

Tween 80 çözeltisi	Miktar
NaCl	8,5 g
Pepton	1 g
Tween 80	1 g
Distile su	1 L

3.1.3 Okratoksin A analizinde kullanılan çözgen ve materyaller

Okratoksin A standartları Sigma- Aldrich firmasından temin edilmiştir (Steinheim, Almanya). Mikotoksin analizinde kullanılan çözgenler HPLC saflığındadır ve Merck (Darmstadt, Almanya)'den sağlanmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 *Aspergillus* section *Nigri* izolatlarının OTA oluşturma özelliklerinin belirlenmesi

Bu kapsamda kuru incirden izole edilen *Aspergillus* section *Nigri* üyesi küflerin okratoksin A oluşturma özellikleri ve okratoksin A oluşumuna sıcaklığın etkisi incelenmiştir.

3.2.1.1 Küf izolatlarının ve spor süspansiyonlarının hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan küf izolatları malt extract agar besiyerine aşılanarak 25°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda %0,5'lik Tween 80 çözeltisi kullanılarak küf izolatlarının 1-4x10^6 adet/ml konsantrasyonunda spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan spor süspansiyonundan 1 µL alınarak *A. carbonarius* izolatları Czapek Yeast Agar (CYA) besiyerine, *A.niger* agg. izolatı ise YES besiyerine ekilmiştir. *A. carbonarius* izolatları 10 gün ve *A.niger* agg. izolatları ise7 gün inkübe edilmiştir.

3.2.1.2 Okratoksin A ekstraksiyonu

Okratoksin A ekstraksiyonu Bragulat ve diğ. (2001)'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kolonilerden 3 agar plug kesilerek 2 ml'lik viallere alınmış ve 0,5 mL metanol ile ekstrakte edilmiştir. Extrakt 0,45 µm gözenek çapına sahip filtrelerden süzülmüştür. Ekstrakt yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle OTA varlığı açısından analizlenmiştir.

3.2.1.3 Okratoksin A analizi için HPLC koşulları

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile OTA analizinin dörtlü çözgen dağıtım sistemi, fluoresans dedektör, degasser ünitesi içeren Agilent 1100 HPLC sistemi kullanılmıştır. Veriler Chemstation 3D yazılım programı yardımıyla değerlendirilmiştir. OTA ayrımı, oda sıcaklığında C18 (150 mm x 4,6mm, 5 µm partikül çaplı) ters faz kolonda hareketli faz olarak asetonitril: su: asetik asit (99:99:2, v/v/v) çözgen sistemi kullanılarak 1 mL/dak. akış hızında gerçekleştirilmiştir.

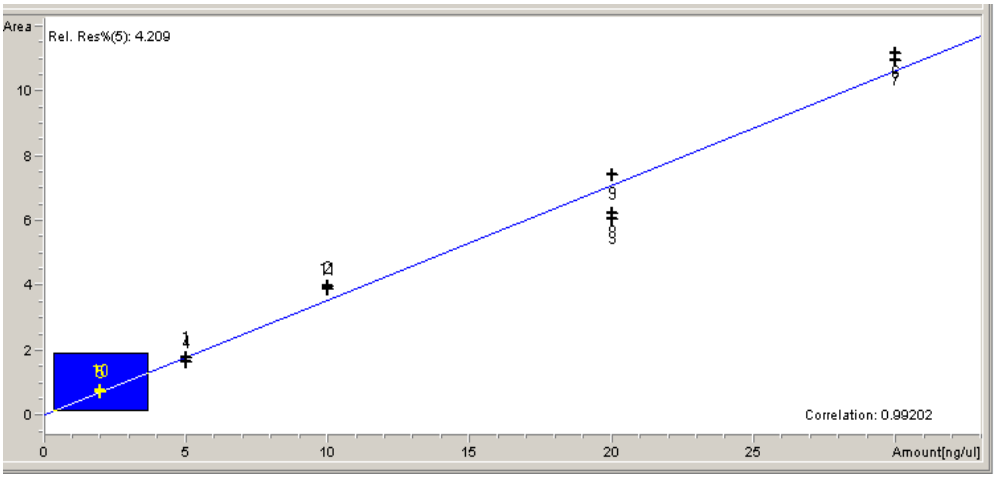
3.2.1.4 OTA standartlarının hazırlanması

Stok çözeltiden (29,25 µg/mL), 2,5µg/mL konsantrasyonunda toluen: asetik asitte (99:1, v/v) standart çözelti hazırlanmıştır. Çalışma standardını hazırlamak için 0,5 mL standart çözelti temiz bir tüpe alınarak azot altında kurutulmuştur. 1-2 mL enjeksiyon çözeltisinde (asetonitril: su: asetik asit, 20:80:2, v/v/v) çözülmüştür. Daha sonra balon jojede 5 mL'ye tamamlanarak 0,25 µg/mL konsantrasyonunda çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Çalışmada 2-30 ng/mL konsantrasyonlarında kalibrasyon çözeltileri kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Kalibrasyon çözeltileri çalışma standardından

gerekli miktarın balonjojede enjeksiyon çözgeninde seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Okratoksin A analizi için oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8 : Okratoksin A kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması.

Kalibrasyon çözeltisinin konsantrasyonu (ng/mL)	Çalışma standardından alınan miktar (µL)	Enjeksiyon çözgeni miktarı (µL)
2.0	40	4960
5.0	100	4900
10.0	200	4800
20.0	400	4600
30.0	600	4400



Şekil 3.1 : Okratoksin A kalibrasyon grafiği.

3.2.1.5 Geri kazanım oranının belirlenmesi

OTA analizi için geri kazanım oranının belirlenmesi için OTA düzeyi 2,9 µg/mL ve 3,4 µg/mL olacak şekilde besiyerine OTA ilave edilmiştir. Toksin ekstraksiyonu 3.2.1.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım oranları 2,9 µg/mL için %80 ve 3,4 µg/mL için %70 olarak belirlenmiştir.

3.2.2 İzolatların optimum OTA oluşturma sıcaklıklarının belirlenmesi

OTA üretici *A. carbonarius ve A. niger* agg. izolatlarından 25 ve 30°C'de oluşturdukları toksin miktarları dikkate alınarak 3 adet *A. carbonarius* ve 1 adet *A. niger* agg. seçilmiştir. *A. carbonarius* izolatları CYA besiyerine, *A. niger* izolatları ise YES besiyerine inokule edilmiştir. İzolatlar 5-40 °C'de (5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C) 8 farklı sıcaklık derecesinde inkübe edilerek 3., 5., 7., ve

10. günlerde okratoksin A oluşturma özellikleri mikotoksin ekstraksiyonu gerçekleştirildikten sonra HPLC ile incelenmiştir.

3.2.3 İzolatların optimum gelişme sıcaklıklarının incelenmesi

CYA besiyerine inoküle edilen 3 adet *A.carbonarius* ve YES besiyerine inoküle 1 adet *A.niger* agg. izolatı 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40'de 10 güne kadar inkübe edilmiştir. Küf gelişmesi günlük olarak koloni çaplarının 2 açıdan ölçülmesi ile belirlenmiştir. Zamana karşı koloni çaplarının lineer ilişkisi, büyüme oranlarının (mm/gün) belirlenmesinde kullanılmıştır. Çaplarının 5 mm'ye ulaştığı süre hesaplanarak da lag fazı süreleri (uyum fazı süreleri) belirlenmiştir (Astoreca ve diğ., 2007).

3.3 Hesaplamalar ve İstatistiksel Analiz

Küf gelişmesine sıcaklığın etisinin belirlenmesi amacıyla ölçülen zamana karşı koloni çapının lineer ilişkisinden gelişme hızı (mm/gün) ve lag fazı süreleri (gün) Microsoft Excel 2007 kullanılarak hesaplanmıştır. Gelişme hızı elde edilen eğrinin eğimi, çapların 5mm'ye ulaştığı süre de lag fazı süresidir.

Gelişme hızı, lag fazı süresi ve OTA üretimi üzerine sıcaklığın etkisi α=0,05 önem düzeyinde tek yollu ANOVA ile araştırılmıştır. Ortalamalar Tukey testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizler Minitab (MİNİTAB R14.11) program ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 *Aspergillus* section *Nigri* Üyesi Küflerin Okratoksin A Üretimleri

Çalışma kapsamında kuru incirden izole edilen *Aspergillus* section *Nigri* üyesi küflerin okratoksin A (OTA) oluşturma özellikleri ve OTA oluşumuna sıcaklığın etkisi katı besiyerinde incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin OTA oluşturma özellikleri 25°C ve 30°C'de 7 ve 10 günlük inkübasyon süresi sonunda belirlenmiştir. İncelenen *Aspergillus* section *Nigri* üyesi izolatlar ve ürettikleri OTA miktarları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : *Aspergillus* seciton *Nigri* üyesi izolatlar ve besiyerinde OTA üretim miktarları.

No	İzolat kodu	Tür	OTA (µg/g)		No	İzolat kodu	Tür	OTA (µg/g)	
			25°C	30°C				25°C	30°C
1	9Y1	*A. carbonarius*	3,02	0,86	16	15D2	*A. niger* agg.	-	-
2	46D2	*A. carbonarius*	2,75	0,89	17	16X2	*A. niger agg.*	-	-
3	57D1	*A. carbonarius*	1,73	0,55	18	16M2	*A. niger agg.*	-	-
4	65D9	*A. carbonarius*	-[1]	0,19	19	17D6	*A. niger* agg.	0,02	0,029
5	1-04D1	*A. carbonarius*	8,46	5,46	20	18M5	*A. niger* agg.	-	-
6	8-04D2	*A. carbonarius*	0,36	0,79	21	23D1	*A. niger* agg.	-	-
7	9-04D1	*A. carbonarius*	0,21	-	22	24X2	*A. niger* agg.	-	-
8	20-04X2	*A. carbonarius*	-	-	23	25D2	*A. niger* agg.	0,001	0,001
9	21-04D1	*A. carbonarius*	0,19	0,14	24	27D2	*A. niger* agg.	0,001	-
10	39-04X4	*A. carbonarius*	3,18	0,82	25	28X1	*A. niger* agg.	-	-
11	6Y1	*A. niger agg.*	0,05	0,07	26	31D2	*A. niger* agg.	-	-
12	8D3	*A. niger agg.*	0,002	-	27	57M2	*A. niger* agg.	-	-
13	9D4	*A. niger agg.*	-	-	28	8-04X2	*A. niger* agg.	-	-
14	12D7	*A. niger* agg.	0,001	0,001	29	27-04D1	*A. niger* agg.	0,001	0,007
15	14D5	*A. niger* agg.	0,001	-	30	44-04X1	*A. niger* agg.	0,002	0,004

[1]: Mikotoksin belirlenmemiştir.

Çalışmada OTA oluşturma potansiyelleri incelenen 10 adet *A. carbonarius* izolatının 9 adedi OTA üreticisidir. İzolatlardan 65D9 kodlu izolat sadece 30°C'de, 9-04D1 kodlu izolat ise sadece 25°C'de OTA üretmiştir. İzolatlar 25°C'de 0,19-17,30 µg/g düzeyinde, 30°C'de ise 0,14-5,46 µg/g düzeyinde OTA oluşturmuştur. *A. niger* agg. izolatları 25°C'de %40, 30°C'de %30 oranında OTA üreticisidir. İzolatlar 25°C'de 0,001-0,05 µg/g, 30°C'de ise 0,002- 0,07µg/g düzeyinde OTA üretmiştir.

Battilani ve diğ. (2006), *A. niger* aggregate (*A. niger* agg.) ve *A. carbonarius*'un OTA üretimini inceledikleri çalışmalarında, *A. niger* agg.'nin %8, *A. carbonarius*'un %90 oranında OTA ürettiğini saptamıştır. CYA besiyerinde *A. niger* agg. izolatlarından 22 adedinin 10 µg/kg'ın altında, 31 adedinin 10-100 µg/kg arasında ve sadece 9 adedinin 100 µg/kg'dan fazla OTA ürettiği saptanmıştır. *A. carbonarius*'un ise 204 adedinin 100 µg/kg'dan fazla OTA ürettiği belirtilmiştir. Frisvad ve diğ. (2011), *Aspergillus niger*'in %17'sinin OTA ürettiğini belirtmişlerdir.

Martins ve diğ. (2005), tarafından yabani *Aspergillus niger* izolatlarının zedelenmiş mısır tanelerinde okratoksin A üretiminin incelendiği çalışmada *A. niger*'in OTA üretimi açısından önemli bir probleme neden olmayacağından bahsedilmiştir. Palumbo ve diğ. (2011), Kaliforniya kuru üzümlerinden izole ettikleri 400 adet *Aspergillus* section *Nigri* üyesi izolatın OTA üretme kapasitelerini kuru üzüm besiyerinde (raisin agar) incelemişlerdir. İzolatların %3'ünü oluşturan *Aspergillus carbonarius*'un besiyerinde 0,9-15 µg/g OTA oluşturduğunu belirlemişlerdir. Noonim ve diğ. (2008), kahve çekirdeklerinde okratoksin A üreticisi *Aspergillus* türlerinin ile ilgili çalışmada, *A. carbonarius* izolatlarının tamamının önemli oranda OTA ürettiklerini belirlerken, *A. niger* izolatlarının ise *A. carbonarius*'a göre daha düşük düzeyde OTA ürettiğini belirlemişlerdir.

Amezqueta ve diğ. (2008), yaptıkları çalışmada depolanmış kakao çekirdeklerinden izole ettikleri 13 adet *A. niger* agg. ve 3 adet *A. carbonarius*'un OTA üretim özelliklerini Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerinde incelemişlerdir. *A. niger* aggregate izolatlarından 9 adedinin tayin limiti üzerinde, 1 adedinin tayin ve belirleme limiti arasında OTA oluşturduğu olduğu saptanmıştır, 3 izolatın ise toksin üreticisi olmadığı belirlenmiştir. Çalışma kapsamında incelenen 3 adet *A.carbonarius* da tayin limitinin üzerinde OTA üreticisidir.

Aspergillus section *Nigri* üyesi *Aspergilus carbonarius*'un daha yüksek miktarda ve sıklıkta OTA üreticisi olduğu bildirilmiştir ancak doğada bulunma sıklığı daha azdır. Gıdalarda yaygın olarak bulunan *Aspergillus niger* ise düşük seviyede ve sıklıkta okratoksin A üretmektedir (Pitt, 2000). *A. niger* ve *A.carbonarius*'un OTA üretiminn incelendiği çalışmalarda genel olarak asıl okratoksin A üretcisinin *A. carbonarius* olduğu rapor edilmektedir (Belli ve diğ., 2006; Noonim ve diğ., 2008; Techarat ve diğ., 2012).

Bir diğer çalışma 2 adet *A. carbonarius* ve 42 adet *A. niger* aggregate kullanılarak yapılmıştır. Çalışılan 2 adet *A. carbonarus*'un da yüksek miktarda OTA (9,275-12,168 µg/kg) ürettiği belirlenmiştir. *A. niger* agg. izolatları ise %60 oranında ve düşük düzeyde (0.1-37.12 µg/kg) okratoksin A üretimine sahiptir (Techarat ve diğ., 2012).

Üzümlerde mikrofloranın ve *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin okratoksin üretiminin incelendiği çalışmada Arjantin üzümlerden izole edilen *Aspergillus* section *Nigri* üyesi 63 türün okratoksin A üretimleri incelenmiştir. İzolatların %41,3'ünün kültür ortamında 2-24,5 ng/ml oranında OTA üreticisi olduğu belirlenmiştir (Magnoli ve diğ., 2003). İspanya üzüm bağlarından alınan örneklerde yapılan diğer bir çalışmada *A. niger* agg.'nin %2-7, *A. carbonarius*'un da % 78–100 oranında okratoksijenik olduğu belirlenmiştir (Belli ve diğ., 2006).

Gerçekleştirilen çalışmada *A. carbonarius* izolatlarının CYA besiyerinde %90 oranında OTA üreticisi olduğu belirlenmiştir. *A. niger* ise YES besiyerinde %45 oranında OTA üretmiştir. Çalışma sonuçlarına göre *A.niger* agg., *A. carbonarius* izolatlarına oranla düşük miktarda ve sıklıkta OTA üretimi gerçekleştidiği sonucuna varılmıştır. Sonuçlar bu kapsamda literatür ile uyum göstermektedir. Ancak Moslem ve diğ., (2010) kahve çekirdeklerinden izole edilen *Aspergillus* şusları ile yaptıkları çalışmada izolatların %90'ının okratoksijenik olduğunu bulmuşlardır. *A. niger* %80 oranında 0,2-2,2 µg/g aralığında OTA üretirken, *A. carbonarius* %100 oranında 0,82-1,70 µg/g aralığında OTA üretmiştir. *A. carbonarius*'un *A. niger*'e oranla yüksek OTA üretim sıklığına sahip olduğu ancak *A. niger*'in daha yüksek düzeyde okratoksin A üretimi gerçekleştirdiği rapor edilmiştir.

4.2 *Aspergillus* section *Nigri* Üyesi Küflerin Gelişimine Sıcaklığın Etkisi

İzolatların 25 ve 30°C'de okratoksin A üretme özellikleri dikkate alınarak seçilen 3 adet *Aspergillus carbonarius* ve 1 adet *Aspergillus niger* agg.'in gelişmesine sıcaklığın etkisi 8 farklı sıcaklıkta (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C) incelenmiştir. Çalışma 2 tekrar ve 2 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Koloni çaplarının zamana karşı grafikleri çizilerek izolatların gelişme hızları ve çaplarının 5 mm'ye ulaştığı süre hesaplanarak lag fazı süreleri (uyum fazı süreleri) belirlenmiştir. İzolatların zamana karşı koloni çaplarına ait grafikler Ek A'da verilmiştir. Gelişme eğrisi grafiklerinden elde edilen gelişme hızları (mm/gün) ve lag fazları da Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1-4.2'da gösterilmiştir. İzolatların 3., 5. 7. ve 10. günlere ait fotoğraflar Çizelge 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6 da gösterilmiştir.

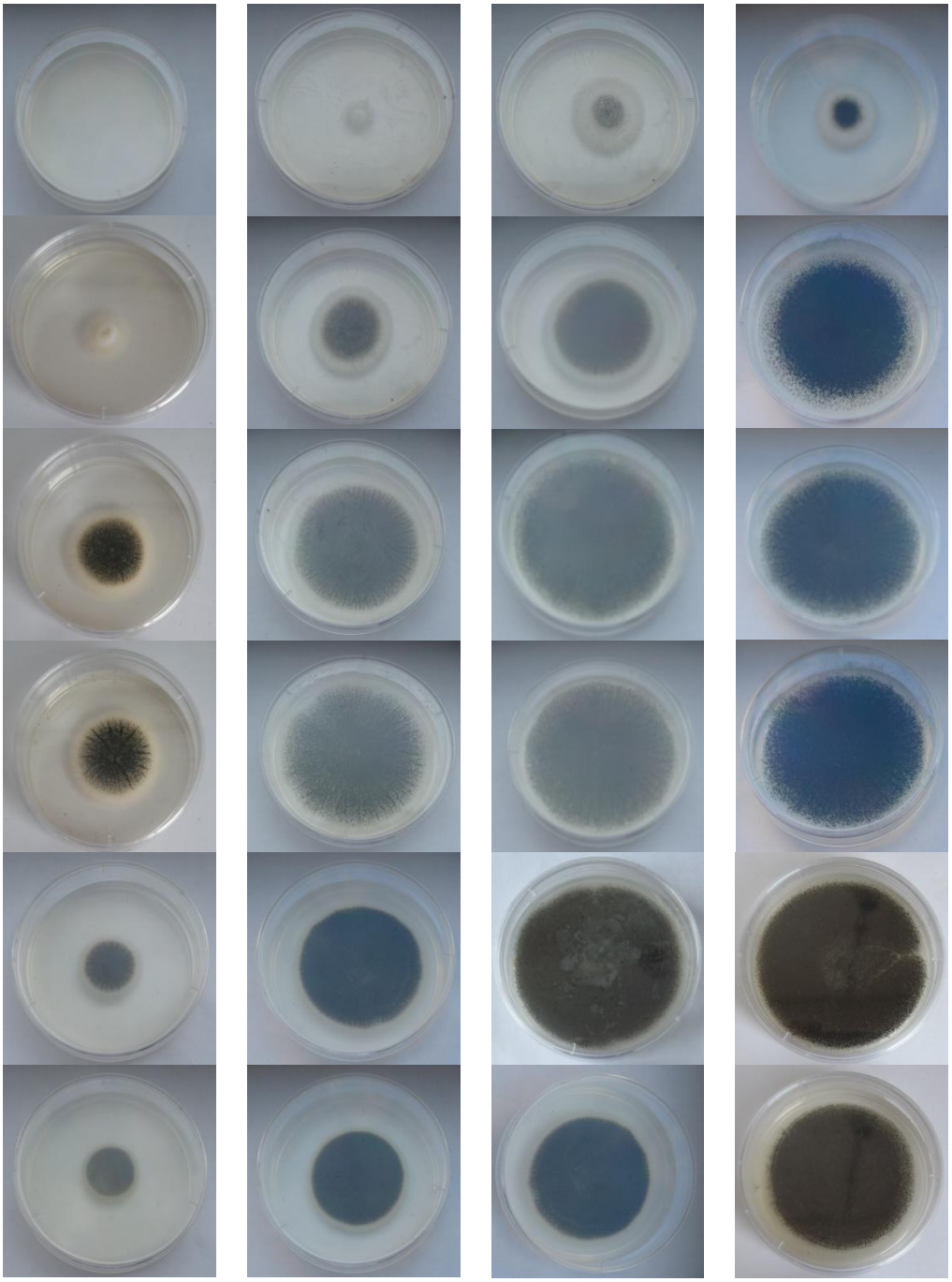
Çizelge 4.2 : İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişme hızları ve lag fazı süreleri.

	Aspergillus carbonarius						***Aspergillus niger* agg.**	
	8-04D2		**21-04D1**		**46D2**		**6Y1**	
Sıcaklık	**Gelişme Hızı, mm/gün**	**Lag Fazı , gün**	**Gelişme Hızı, mm/gün**	**Lag Fazı, gün**	**Gelişme Hızı, mm/gün**	**Lag Fazı, gün**	**Gelişme Hızı, mm/gün**	**Lag Fazı, gün**
5ºC	GG	-	GG	-	GG	-	GG	-
10 ºC	GG	-	GG	-	GG	-	GG	-
15 ºC	3,048[a]	7,260[a]	2,760[a]	7,860[a]	2,568[a]	8,070[a]	3,288[a]	5,390[a]
20ºC	11,616[b]	2,166[b]	11,880[b]	1,901[b]	11,232[b]	1,978[b]	9,408[b]	1,800[b]
25 ºC	11,208[b]	0,755[b]	12,744[b]	0,839[c]	11,952[b]	0,820[c]	13,080[c]	1,121[c]
30 ºC	18,024[c]	1,168[b]	16,512[c]	1,314[d]	16,152[c]	1,279[d]	25,968[d]	0,937[ce]
35 ºC	13,416[d]	1,199[b]	GG	-	GG	-	24,648[d]	1,062[ce]
40 ºC	7,728[e]	3,008[b]	GG	-	GG	-	15,216[c]	0,867[de]

GG: Gelişme görülmedi

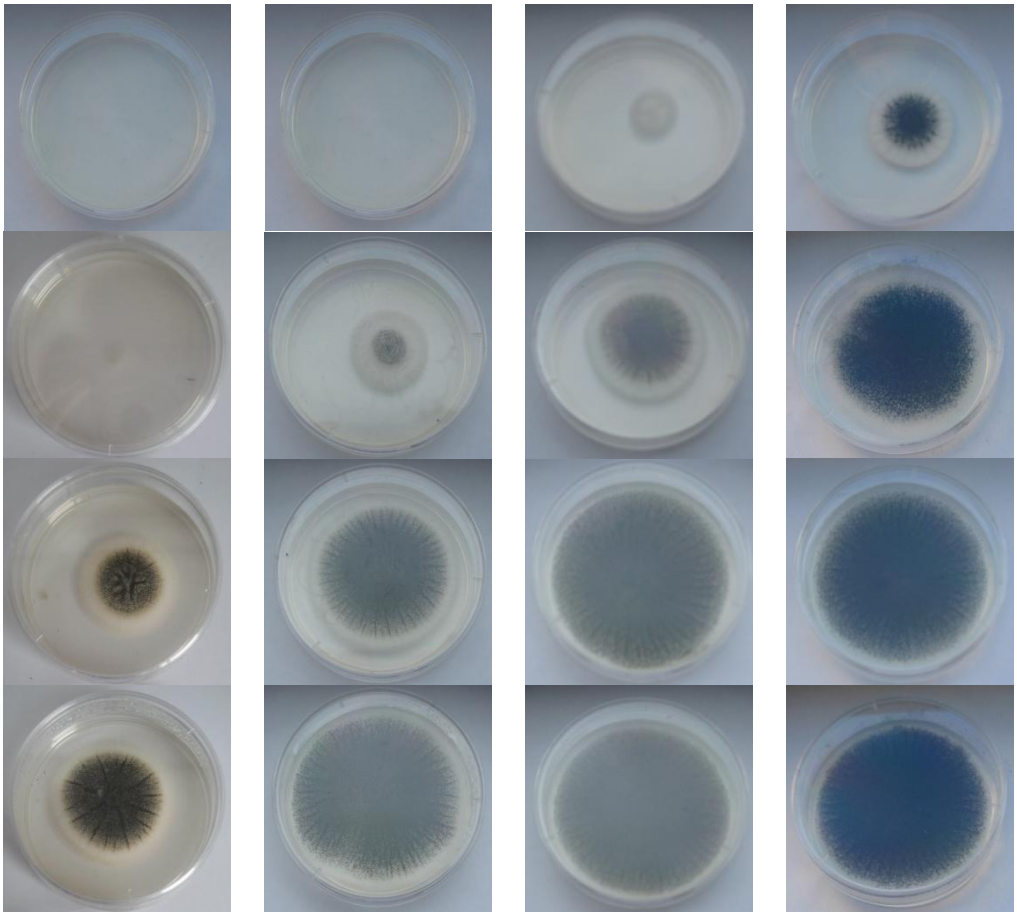
[a,b,c,d,e]: Her izolat için aynı kolonda yer alan değerlerde aynı harf içeren istatistiksel olarak farklı değildir.

Çizelge 4.3 : *Aspergillus carbonarius* 8-04D2 izolatına ait fotoğraflar.

Sıcaklık (°C)	Süre(gün)			
	3.gün	5.gün	7.gün	10.gün
5°C	GG[1]	GG	GG	GG
10°C	GG	GG	GG	GG
15°C				
20°C				
25°C				
30°C				
35°C				
40°C				

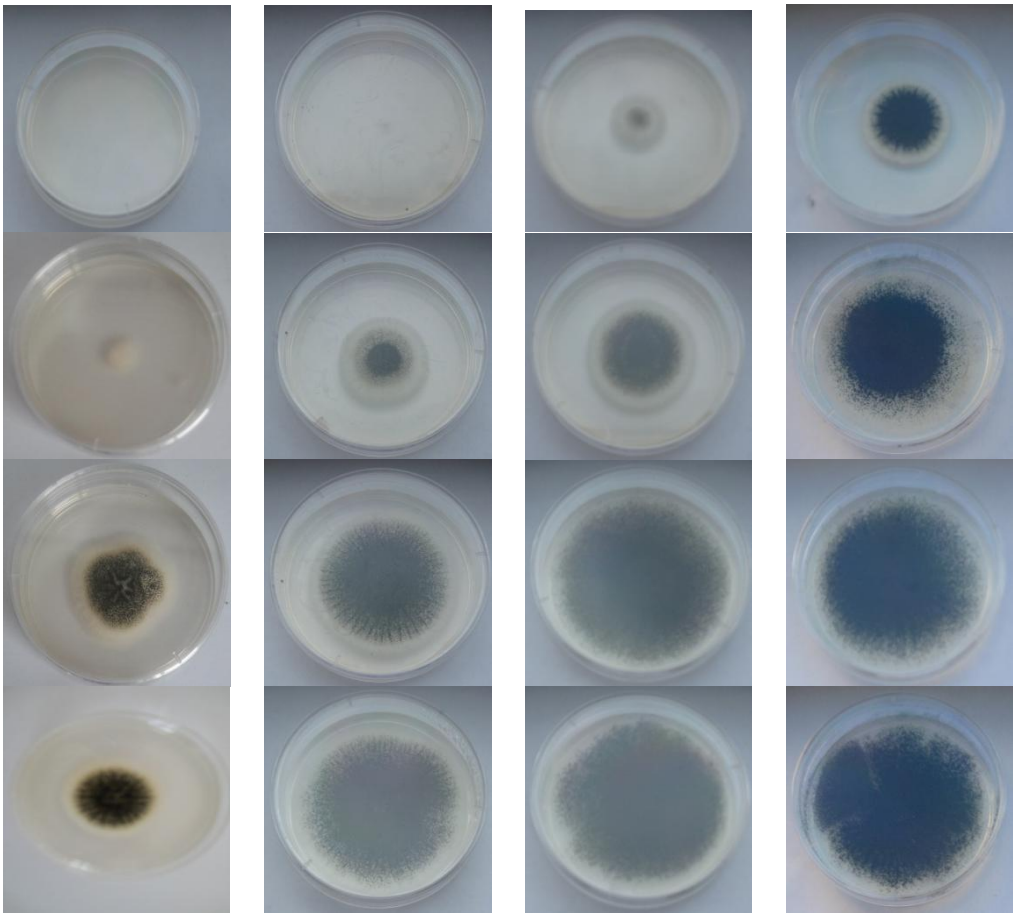
[1]: Gelişme görülmedi.

Çizelge 4.4 : *Aspergillus carbonarius* 21-04D1 izolatına ait fotoğraflar.

Sıcaklık (°C)	Süre(gün)			
	3.gün	5.gün	7.gün	10.gün
5°C	GG	GG	GG	GG
10°C	GG	GG	GG	GG
15°C				
20°C				
25°C				
30°C				
35°C	GG	GG	GG	GG
40°C	GG	GG	GG	GG

Çalışmada kullanılan izolatların hiçbiri 5 ve 10°C'de gelişme göstermemiştir. 4 adet *Aspergillus* section *Nigri* izolatından 1 adet *Aspergillus carbonarius* (8-04D2) ve 1 adet *Aspergillus niger* agg. (6Y1) izolatı 40°C'de gelişmiştir. Diğer 2 *Aspergillus carbonarius* izolatı (21-04D1 ve 46D2) 35 ve 40°C'de gelişme göstermemiştir. *A. carbonarius* izolatlarından sadece 8-04D2 kodlu izolat 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişmiştir.

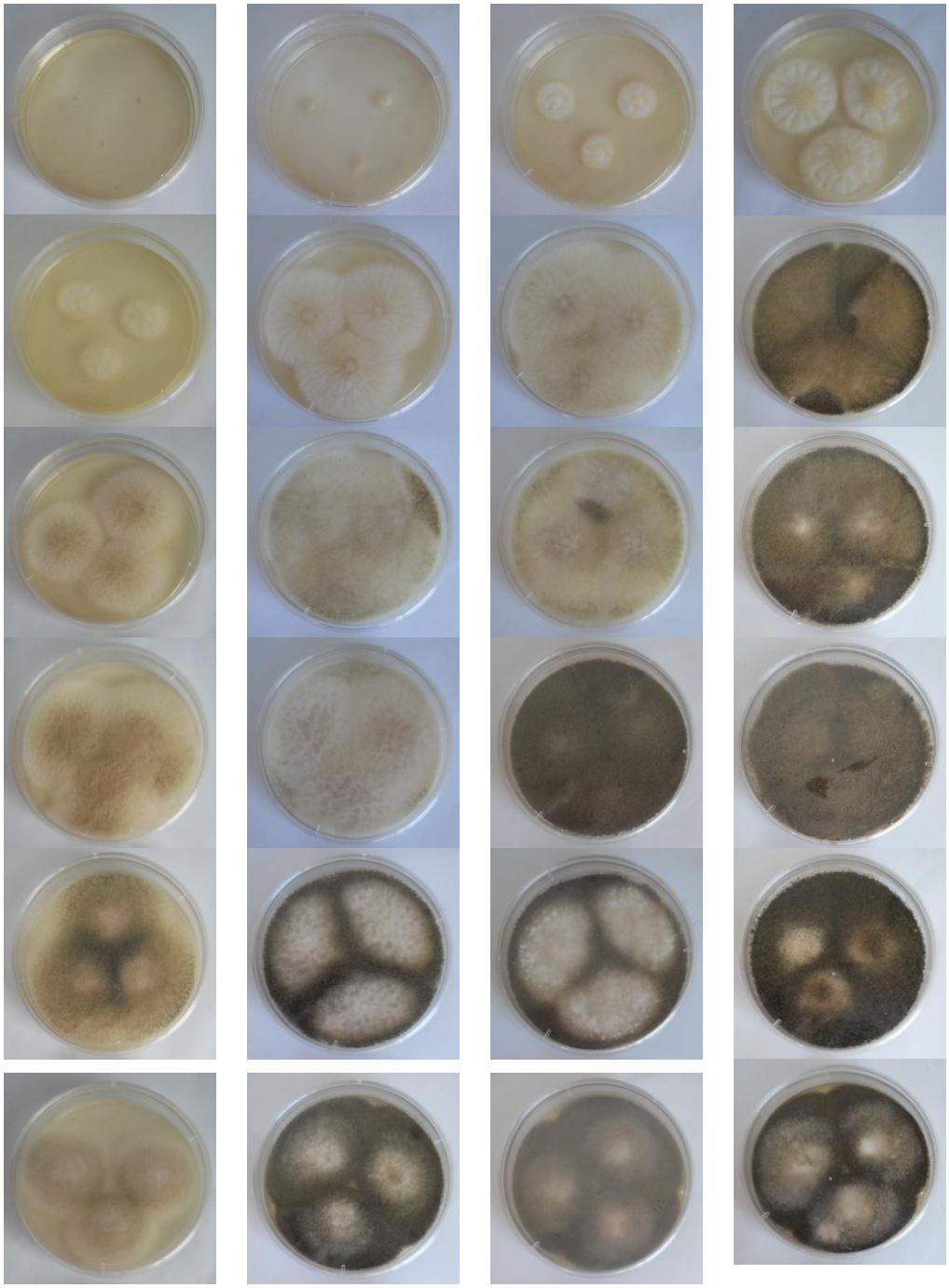
Çizelge 4.5 : *Aspergillus carbonarius* 46D2 izolatına ait fotoğraflar.

Sıcaklık (°C)	Süre(gün)			
	3.gün	5.gün	7.gün	10.gün
5°C	GG	GG	GG	GG
10°C	GG	GG	GG	GG
15°C				
20°C				
25°C				
30°C				
35°C	GG	GG	GG	GG
40°C	GG	GG	GG	GG

Pitt ve Hocking (2009), tarafından *Aspergillus niger* için gelişme sıcaklıklarının minimum 6-8°C, maksimum 45-47°C ve optimum 35-37°C olduğu belirtilmiştir. *Aspergillus carbonarius*'un ise 10°C'de geliştiği ancak 7-8°C'de gelişmediği, optmimum gelişmenin 30°C, maksimum gelişmenin 41°C'de olduğu ifade edilmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmanın sonuçları *A. carbonarius* için paralellik göstermektedir. Gerçekleştirilen çalışmada kullanılan tek bir *Aspergillus niger* agg.

ise optimum 30°C'de gelişmiştir. Bununla birlikte istatistiksel analiz sonucunda 30 ve 35°C arasında önemli bir farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$).

Çizelge 4.6 : *Aspergillus niger* agg. 6Y1 izolatına ait fotoğraflar.

Sıcaklık (°C)	Süre(gün)			
	3.gün	5.gün	7.gün	10.gün
5°C	GG	GG	GG	GG
10°C	GG	GG	GG	GG
15°C				
20°C				
25°C				
30°C				
35°C				
40°C				

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1-4.2'den görüldüğü gibi izolatların tümünün en hızlı geliştiği sıcaklık 30°C, en yavaş geliştiği sıcaklık ise 15°C'dir. 30°C'de en hızlı gelişen izolatın, günde 25,968 mm gelişen 6Y1 nolu *Aspergillus niger* agg., en yavaş gelişen izolatın ise günde 16,152 mm gelişen 46D2 nolu *Aspergillus carbonarius* olduğu saptanmıştır.

Esteban ve diğ. (2004), 12 adet *A.niger* izolatının OTA üretimine sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisini incelemişlerdir. Çalışmada izolatların 11 adedinin YES besiyerinde 10-45°C aralığında geliştiği, CYA besiyerinde ise sadece 4 izolatın bu sıcaklık aralığında gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte CYA besiyerinde izolata bağlı olarak küf gelişmesi daha dar bir aralıkta saptanmıştır. Lasram ve diğ. (2010)'nin 6 adet *A. carbonarius*'un gelişme ve OTA üretim özelliklerini inceledikleri çalışmada *A.carbonarius* için optimum gelişme sıcaklığının 30°C olduğunu belirlemişlerdir. Benzer olarak, Astoreca ve diğ. (2007)'nin, 3 adet *Aspergillus niger*, 3 adet *Aspergillus awamori* ve 1 adet *Aspergillus carbonarius*'un gelişmesine sıcaklık ve su aktivitesinin etkisini inceledikleri çalışmada izolatların tümü optimum 30°C'de gelişmiştir.

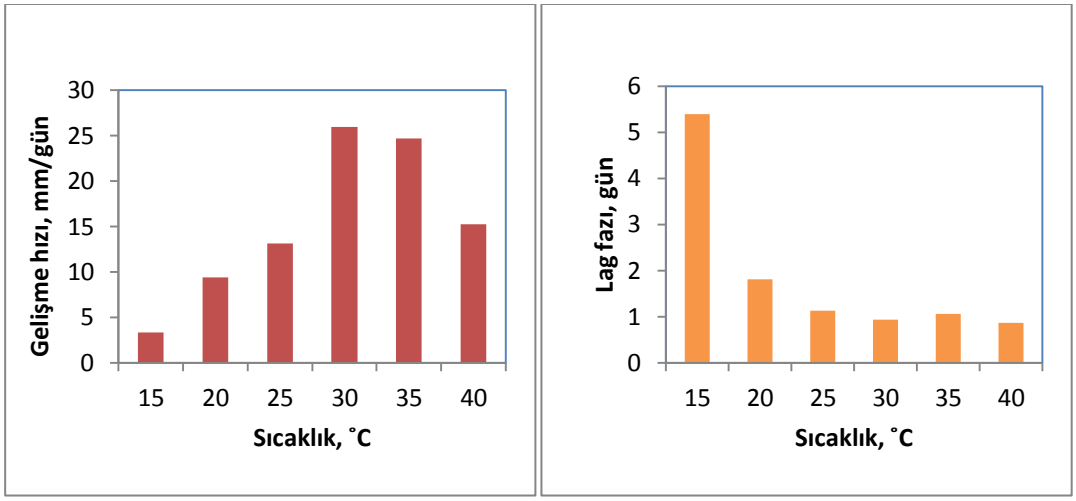
Cabrera ve diğ. (2005) ve Romeo ve diğ. (2007), farklı su aktivitesi değerlerinde *Aspergillus carbonarius*'un gelişmesine sıcaklık ve su aktivitesinin etkisini incelemiş optimum gelişmenin 30°C'de olduğunu saptamışlardır. Cabrera ve diğ. (2005), *Aspergillus niger* için optimum gelişmenin 35°C'de olduğunu rapor etmişlerdir. Gerçekleştirilen çalışmada CYA besiyerinde *A. carbonarius* için optimum gelişme sıcaklığı 30°C olarak belirlenmiştir. *A. niger* agg. izolatı ise optimum 35°C'de gelişmiştir. Bununla birlikte istatistiksel olarak 30 ve 35°C arasında önemli bir farklılık belirlenmemiştir.

Spadaro ve diğ. (2010), 3 adet *A. carbonarius* izolatının gelişmesine ve OTA oluşturmasına, sıcaklık, su aktivitesi ve pH'nın etkisinin inceledikleri çalışmada optimum gelişme sıcaklığını bu çalışmanın sonuçlarına paralel olarak 30°C olarak saptamıştır. Patharajan ve diğ. (2011), üzümlerden elde ettikleri *A. carbonarius* izolatlarının gelişme özelliklerini 15, 25, 30 ve 35°C olmak üzere 4 farklı sıcaklık, su aktivitesi ve pH değerinde incelemiş ve bu çalışmanın sonuçlarına paralel olarak optimum gelişmenin 30°C'de olduğunu saptamışlardır.

Astoreca ve diğ. (2009), *Aspergillus niger* agg. üyelerinin gelişme hızına sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Çalışılan sıcaklıklar içinde optimum gelişmenin 12,4 ve 16,6 mm/gün ile 30°C'de olduğu görülmüştür.

Oueslati ve diğ. (2010), 20/30, 20/37 ve 25/42°C şeklinde dönüşümlü sıcaklığın *A. carbonarius*'un gelişimine etkisini incelemişlerdir. Optimum gelişmenin 20/30°C dönüşümünde olduğu sonucuna varılmıştır. Astoreca ve diğ. (2010), ışınlama uygulaması yaptıkları kurutulmuş üzümlerde *A. carbonarius* gelişmesini ve OTA üretimini incelemişlerdir. Optimum gelişme sıcaklığı su aktivitesine bağlı olarak 25-30°C'de gözlenirken, istatistiksel olarak 25-30°C arasında önemli bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir.

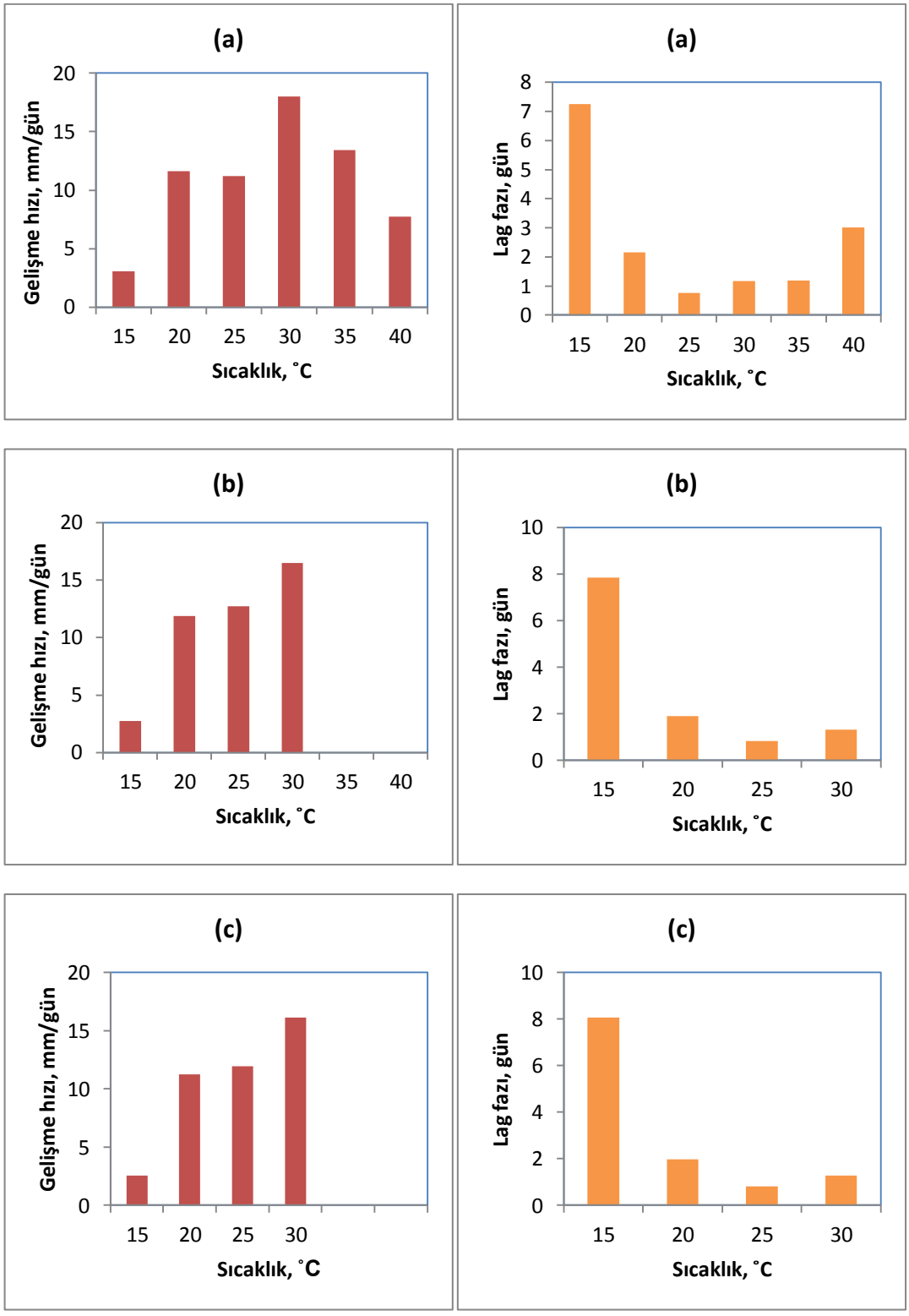
Alborch ve diğ. (2011), tarafından mısır tanelerinde *A. carbonarius*'un optimum gelişmesinin 20-35°C aralığında olduğunu bulmuşlardır. *A. niger* için ise optimum gelişmenin 25-40°C aralığında olduğu, maksimum çapın ise 30-35°C'de ölçüldüğü ifade edilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.1-4.2'de görüldüğü üzere bu çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir.



Şekil 4.1 : 6Y1 nolu *Aspergillus niger* izolatının gelişme hızı ve lag fazı süresine sıcaklığın etkisi.

Çizelge 4.2, Şekil 4.1 ve 4.2'den görüldüğü üzere gerçekleştirilen çalışmada tüm izolatlar için en uzun lag fazı süresi 15°C'de iken bu sıcaklıkta en uzun lag fazı 8 gün ile 46D2 nolu *Aspergillus carbonarus* izolatına aittir. *A. carbonarius* izolatları için en kısa lag fazı 25°C'dedir. *A. niger* agg. izolatı için ise en kısa lag fazı süresinin *A. carbonarius* izolatlarından farklı olarak 40°C'de olduğu saptanmıştır.

Astoreca ve diğ. (2009), *Aspergillus niger* agg. üyelerin lag fazı süresine sıcaklığın etkisini 15, 25 ve 30°C'de incelemişlerdir. Çalışılan sıcaklıklarda en uzun lag faz 15°C'de, en kısa lag faz ise 30°C'de saptanmıştır.



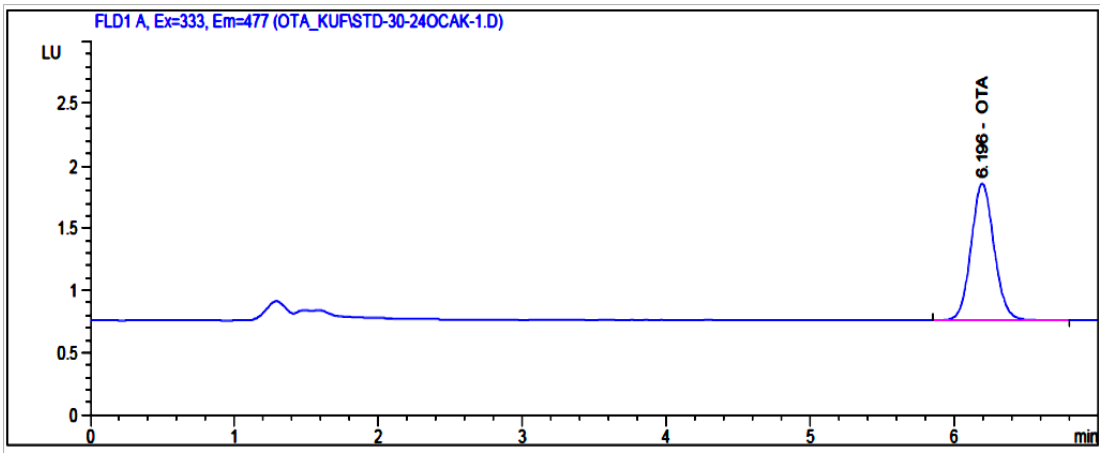
Şekil 4.2 : *Aspergillus carbonarius* izolatlarının gelişme hızı ve lag fazı süresine sıcaklığın etkisi a. 8-04D2, b. 21-04D1, c. 46D2.

Avrupa ülkeleri ve İsrail'den temin edilen üzümlerde *Aspergillus carbonarius*' un gelişme ve OTA üretiminin sentetik üzüm suyu besiyerinde incelendiği çalışmada lag fazın 25-30°C'de 1 günden daha az olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına paralel olarak *Aspergillus carbonarius* için en kısa lag fazın 25-30°C, *Aspergillus niger agg.* için ise 30-35°C'de olduğu saptanmıştır (Mitchell ve diğ., 2004). Romero ve diğ. (2010), *A. carbonarius* izolatlarının gelişme hızı ve lag fazı sürelerini 30°C'de CYA besiyerinde incelemişlerdir. Gelişme hızını 14,7-15,2 mm/gün aralığında lag fazı sürelerini de 0,26-0,45 aralığında bulmuştur.

Belli ve diğ. (2004a), *Aspergillus* section *Nigri* üyeleri ile ilgili yaptıkları çalışmada minimum gelişmenin 10°C'de, optimum gelişme sıcaklığını *A. carbonarius* için 30°C, *A. niger* agg. için ise 37°C olarak bulunmuştur. Bütün izolatlar için en uzun lag fazın 15°C'de görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu çalışmada da kullanılan bütün izolatlar için de en uzun lag fazı 15°C'de gerçekleşmiştir.Romeo ve diğ. (2007), *A. carbonarius* gelişimine sıcaklığın etkisini 15-35°C aralığında incelemişlerdir. Çalışmada en yüksek gelişme hızı 30°C'de, en uzun lag faz ise 0,26 gün ile 35°C'de saptanmıştır.

4.3 *Aspergillus* section *Nigri* Üyesi Küflerin OTA Üretimine Sıcaklığın Etkisi

Çalışmada *Aspergillus* section *Nigri* üyesi 4 izolatın okratoksin A üretimine sıcaklığın etkisi 8 farklı sıcaklıkta (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C) incelenmiştir. Şekil 4.3'de Okratoksin A standardına ait kromatogram görülmektedir.



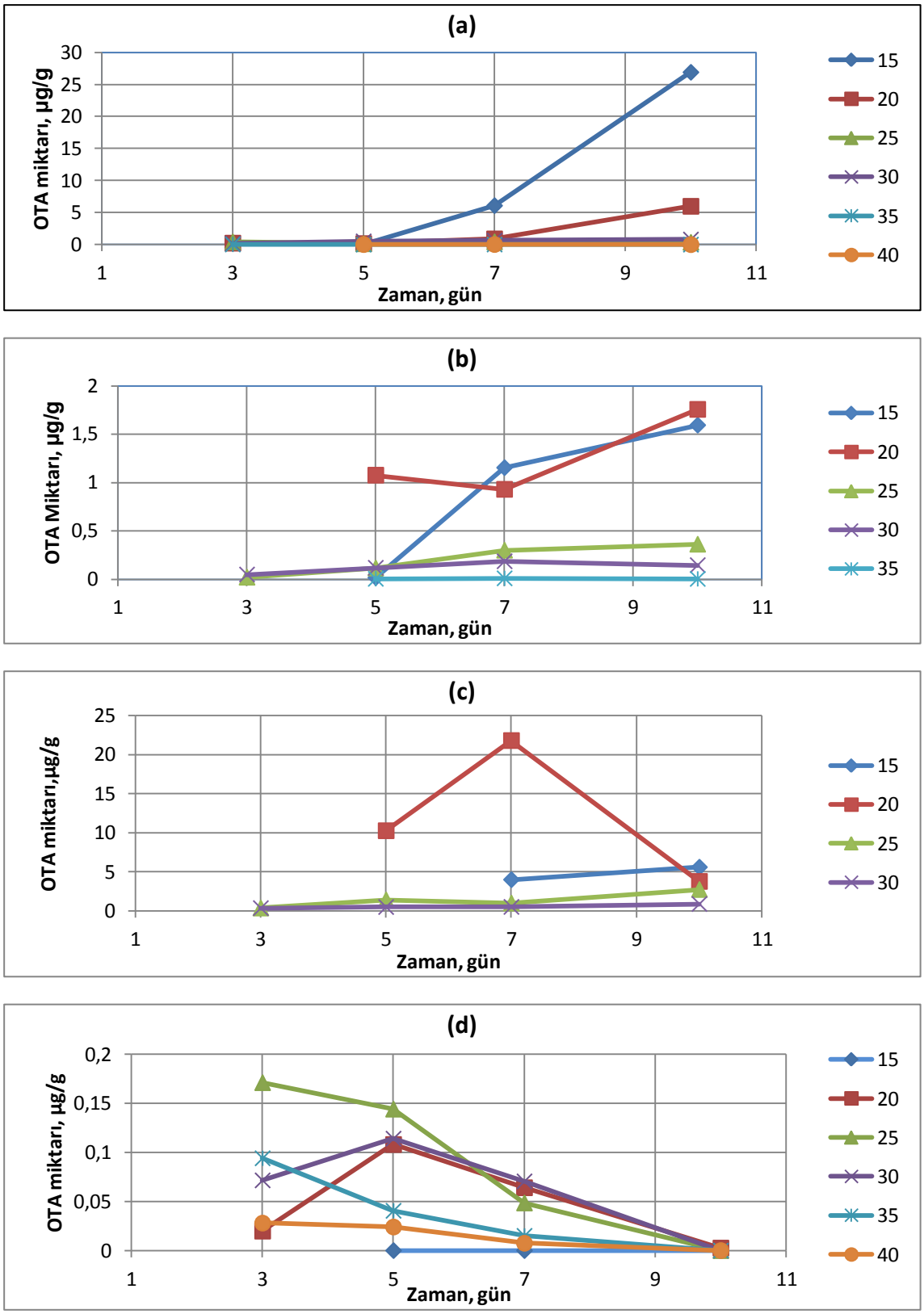
Şekil 4.3 : Okratoksin A standardına ait kromatogram (30µg/g).

Farklı sıcaklıklarda *Aspergillus* section *Nigri* izolatlarının OTA oluşturma miktarları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 : Farklı sıcaklıkların *Aspergillus* section *Nigri* izolatlarının OTA üretimine etkisi.

İzolat kodu	**Günler**	**OTA miktarı, µg/g**							
		5˚C	**10˚C**	**15˚C**	**20˚C**	**25˚C**	**30˚C**	**35˚C**	**40˚C**
8-04D2	3	GG	GG	GG	0,23±0,27	0,42±0,01	0,16±0,14	0,029±0,01	GG
Aspergillus carbonarius	5	GG	GG	0,026±0,01	0,16±0,08	0,14±0,01	0,51±0,16	0,008±0,00	0,015±0,008
	7	GG	GG	6,09±0,470	0,89±0,12	0,45±0,01	0,63±0,16	0,025±0,028	0,020±0,029
	10	GG	GG	26,92±21,58	5,99±0,33	0,41±0,01	0,72±0,25	0,006±0,001	TB
21-04D1	3	GG	GG	GG	GG	0,02±0,001	0,05±0,01	GG	GG
Aspergillus carbonarius	5	GG	GG	0,02±0,01	1,08±0,21	0,12±0,02	0,12±0,04	GG	GG
	7	GG	GG	1,15±0,83	0,93±0,07	0,29±0,07	0,19±0,05	GG	GG
	10	GG	GG	1,59±0,53	1,75±0,03	0,21±0,02	0,12±0,05	GG	GG
46D2	3	GG	GG	GG	GG	0,38±0,39	0,36±0,02	GG	GG
Aspergillus carbonarius	5	GG	GG	GG	10,26±3,05	1,42±0,04	0,51±0,04	GG	GG
	7	GG	GG	4,01±1,13	21,78±3,94	1,01±0,21	0,52±0,15	GG	GG
	10	GG	GG	5,59±1,47	3,78±0,55	2,23±0,06	0,95±0,23	GG	GG
6Y1	3	GG	GG	GG	0,02±0,01	0,17±0,01	0,07±0,01	0,01±0,020	0,028±0,00
Aspergillus niger agg.	5	GG	GG	TB	0,11±0,008	0,15±0,00	0,12±0,04	0,04±0,005	0,03±0,001
	7	GG	GG	TB	0,06±0,006	0,049±0,009	0,07±0,005	0,01±0,001	0,01±0,001
	10	GG	GG	TB	0,01±0,003	TB	TB	TB	TB

GG: Gelişme görülmedi. TB: Toksin belirlenmedi.



Şekil 4.4 : Sıcaklığın *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin OTA üretimine etkisi, a.8-04D2, b. 21-04D1, c. 46D2, d. 6Y1.

Aspergillus section *Nigri* üyesi 4 izolatın tamamı 5 ve 10°C'de gelişmemiştir. *A. carbonarius* izolatlarından 8-04D2, 15-40°C, 21-04D1 ve 46D2 ise 15-30°C arasında gelişmiştir. *A. carbonarius* izolatları gelişmenin gözlendiği her sıcaklık ve inkübasyon süresinde OTA üretmektedir. Bu izolatlar arasında en yüksek miktarda OTA'yı 8-04D2 oluşturmuştur. *A. carbonarius* 8-04D2 izolatının OTA üretimi 15°C ve 30°C'de zamanla artış göstermiştir. Diğer sıcaklıklarda Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4a'da görüldüğü gibi OTA miktarı zamanla artıp azalmıştır. Bu izolat CYA besiyerinde maksimum miktarda OTA'yı 26,92 µg/g düzeyinde 15°C'de 10. günde oluşturmuştur. 15°C'yi sırasıyla 20°C, 30°C, 25°C, 35°C ve 40°C takip etmiştir. 20°C'de toksin miktarı 5. günde 3. güne göre azalmış, 7. ve 10. günlerde ise tekrar artmıştır. 20°C'de en yüksek toksin miktarı 10. günde 5,99 µg/g olarak tespit edilmiştir. 25°C'de maksimum OTA miktarı 7. günde 0,45 µg/g, minimum OTA miktarı ise 5.günde 0,14 µg/g olarak belirlenmiştir. Gelişme hızının maksimum olduğu 30°C'de en yüksek miktarda OTA'ya 10.günde 0,79 µg/g düzeyinde rastlanmıştır. 35°C'de toksin miktarı 3. günden 5. güne azalma gösterirken 7. günde artmış, 10. günde tekrar azalmıştır. Minimum OTA üretimi ise 0,006 µg/g düzeyi ile 10. günde tespit edilmiştir. 40°C'de gelişme 5.günden itibaren gözlenirken OTA varlığı 5. ve 7. günlerde tespit edilebilmiştir. 40°C'de maksimum OTA miktarı 7. günde 0,02 µg/g, minimum OTA miktarı ise 5.günde 0,015 µg/g olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde α=0,05 önem düzeyinde okratoksin A üretimi açısından 15°C, 20, 25, 30, 35°C'den farklı bulunurken diğer sıcaklıklar arasında farklılık yoktur. İstatistiksel olarak OTA üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi yoktur.

Aspergillus carbonarius 21-04D1 izolatının toksin üretimi 15'de zamanla artış göstermiştir. 15°C'de maksimum OTA'ya 1,59 µg/g ile 10. günde rastlanmıştır. 20°C'de toksin miktarı 5. günden 7. güne azalma göstermiş 7. günden 10. güne artmıştır. 25 ve 30°C'de ise OTA miktarı, 7. güne kadar artış gösterirken 10. günde miktarın azaldığı belirlenmiştir. Bu izolat için maksimum düzeyde OTA miktarı 1,75 µg/g ile 20°C ve 10. günde tespit edilmiştir. 25°C'de maksimum OTA üretimi 7.günde 0,29 µg/g düzeyinde belirlenmiştir. Maksimum gelişme sıcaklıklığı olan 30°C'de ise minimum OTA miktarı 0,05 µg/g ile 3. günde, maksimum OTA miktarı ise 0,19 µg/g ile 7. günde tespit edilmiştir. Okratoksin A üretimi, α=0,05 önem

düzeyinde 20°C'de diğer sıcaklıklardan farklı iken, inkübasyon süreleri arasında farklılık yoktur.

Aspergillus carbonarius 46D2 izolatı maksimum düzeyde OTA'yı 21,78 µg/g ile 20°C ve 7. günde üretmiştir. 20°C'yi sırasıyla 15°C, 25°C ve 30°C izlemiştir. *A. carbonarius* 46D2 izolatının OTA üretimi 15 ve 30°C'de zamanla artmış diğer sıcaklıklarda ise değişkenlik göstermiştir. 15°C'de 7. güne kadar gelişme gözlenmemiş, maksimum toksin miktarı 10. günde belirlenmiştir. 20°C'de 5. günden 7. güne toksin miktarı 10,26 µg/g seviyesinden 21,78 µg/g seviyesine çıkarken 10. günde bu miktarda azalma tespit edilmiştir. 25°C'de toksin üretimi 3. günden 5. güne artış, 5. günden 7. güne azalış ve 7. günden 10. güne artış göstermiştir. 25°C için maksimum OTA 2,75 µg/g düzeyinde 10. günde tespit edilmiştir. 30°C'de OTA üretimi zamanla artış göstermiştir. Bu sıcaklık için maksimum OTA miktarı 10. günde 0,89 µg/g, minimum OTA miktarı ise 3. günde 0,36 µg/g olarak tespt edilmiştir. İstatistiksel olarak α=0,05 önem düzeyinde, 20°C'de OTA üretimi, 25 ve 30°C'den farklı iken farklı iken diğer sıcaklıklar ve inkübasyon süreleri arasında farklılık yoktur.

Çalışmada *Aspergillus niger* izolatı 15-40°C arasında gelişme göstermiştir. *A. carbonarius* izolatlarında gelişmenin gözlendiği tüm koşullarda OTA üretimi tespit edilmesine rağmen Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi *A. niger* agg. izolatında bazı koşullarda toksin üretimi belirlenmemiştir. *A. niger* agg. 6Y1 izolatı 15°C'de 5. , 7. ve 10. günlerde gelişmesine rağmen OTA üretmemiştir. 20°C'de ise toksin üretimi 3. günden 5. güne artış gösterirken, 5. günden 10. de güne azalmıştır. OTA miktarı 25°C'de zamanla azalıp artarken 10. günde tespit edilememiştir. 30°C'de maksimum düzeyde OTA 5. günde belirlenirken 10. günde OTA varlığına rastlanmamıştır. 35 ve 40°C'de 30°C'ye benzer olarak toksin miktarı 5. günde artmış, 7. günde azalmış ve 10. günde belirlenememiştir. *A .niger* agg. 6Y1 izolatı maksimum 25°C'de 3. günde 0,17 µg/g düzeyinde OTA üretmiştir. *Aspergillus niger* agg. izolatı için ise α=0,05 önem düzeyinde okratoksin A üretimi açısından 15°C, 25 ve 30°C'den farklı, 25°C, 35 ve 40°C'den farklı 30°C ise 40°C'den farklı bulunmuştur. Günler açısından ise 3. ve 10. günler, 5. ve 7. ve 10. günler arasında ki farklılık önemli bulunmuştur.

Alborch ve diğ. (2011), mısır tanesinde *Aspergillus carbonarius* ve *Aspergillus niger*'in OTA üretimine sıcaklığın etkisini araştırmışlardır. Çalışmada *Aspergillus niger*'in 15-40°C, *Aspergillus carbonarius*'un ise 15-35°C aralığında OTA ürettiği

belirlenmiştir. Her iki küf de 15°C' de maksimum miktarda OTA üretmiştir. Çalıştıkları izolatların mısır tanelerinde geniş bir su aktivitesi ve sıcaklık aralığında inkübasyonun 5. gününden itibaren OTA üretimine başladıklarını tespit etmişlerdir.

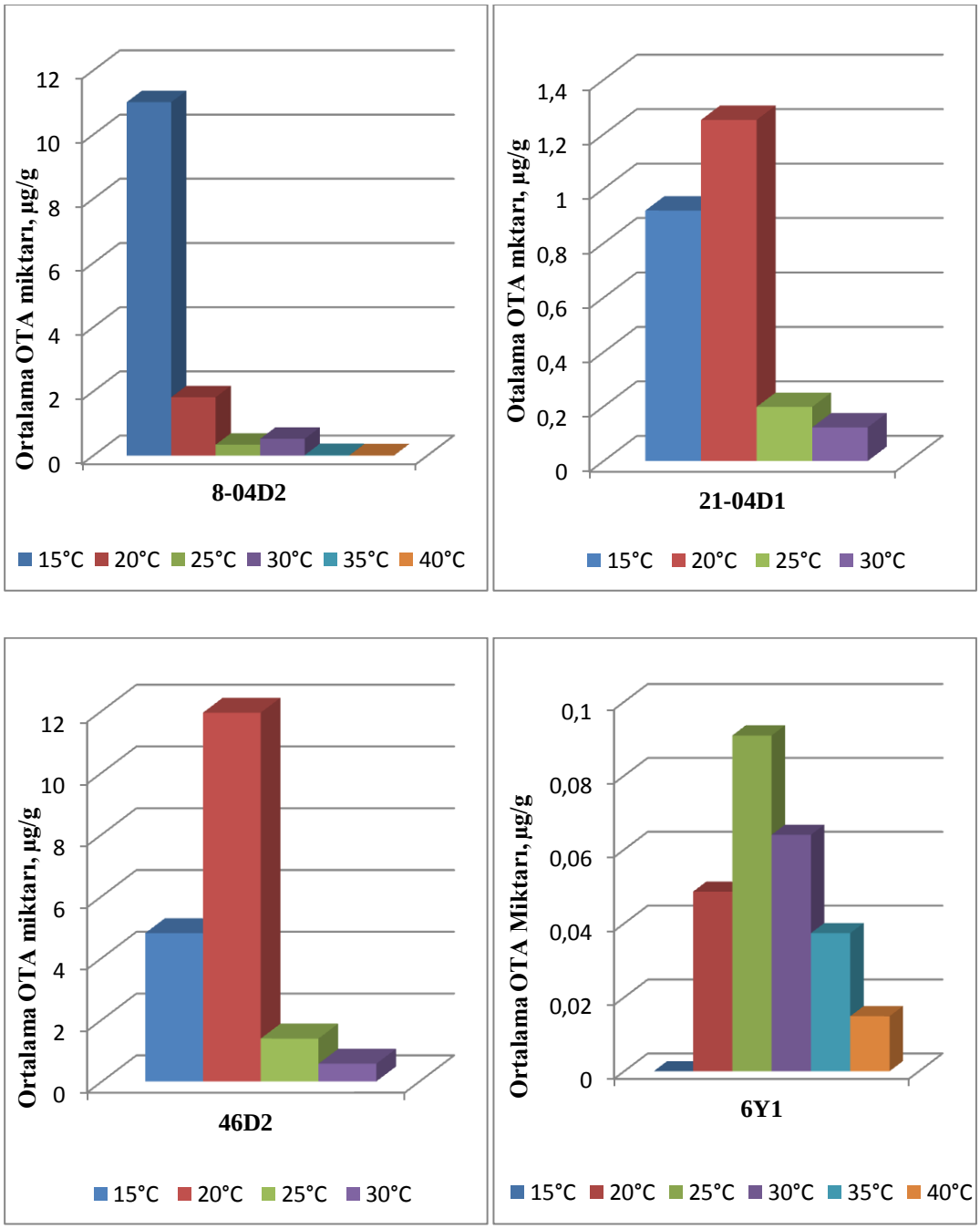
Kapetanakou ve diğ. (2009), yaptıkları çalışmada *A. carbonarius*'un su aktivitesi değerlerine bağlı olarak maksimum düzeyde OTA'yı 20-25°C'de, >25 ng/g ürettiğini saptamışlardır. Oueslati ve diğ. (2010), 20/30, 20/37 ve 25/42 şeklinde dönüşümlü sıcaklıkların *A. carbonarius*'un OTA üretimi üzerine etkisini inceledikleri çalışmada 20/30°C sıcaklık dönşümünde en fazla OTA üretiminin olduğunu belirlemişlerdir. Romero ve diğ. (2010), *A. carbonarius* suşlarının OTA üretimini CYA besiyerinde ve 30°C'de incelemişlerdir. Maksimum OTA üretimi 7,75 µg/g düzeyinde 28. günde belirlenmiştir.

Esteban ve diğ. (2004), *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin okratoksin A üretimine sıcaklığın etkisini *A. niger* için YES besiyeri, *A. carbonarius* için CYA besiyerinde incelemişlerdir. *Aspergillus niger* aggregate maksimum 20-25°C'de YES besiyerinde, *A. carbonarius* ise 15-20°C'de CYA besiyerinde OTA üretmiştir. OTA üretiminin önemli miktarının ilk 5 günlük inkübasyonda gerçekleştiği ve sıcaklığın artması ile birlikte daha kısa sürede maksimum OTA seviyelerine ulaşıldığı belirtilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmada *A. niger* agg. 6Y1 izolatı için Esteban ve diğ., 2004'e benzer şekilde 20, 30, 35 ve 40°C'de maksimum OTA üretimi 5. günde belirlenmiştir. *A. carbonarius* 46D2 ve 21-04D1 izolatı da 5.günde önemli miktarda toksin üretmiştir. Bununla birlikte *A. carbonarius* 8-04D2 izolatı 7. günde yüksek miktarda OTA oluşturmuştur. Esteban ve diğ. (2004), OTA üretimi açısından her izolat için optimum koşullarının farklı olabileceğini belirtmişlerdir. Benzer olarak gerçekleştirilen çalışmada 8-04D2 nolu *Aspergillus carbonarius* izolatının optimum OTA üretimi 15°C'de, 21-04D2 ve 46D2 izolatlarının OTA üretimi en fazla 20°C'de gerçekleşmiştir.

İzolatların farklı sıcaklıklarda inkübasyon süresince ortalama okratoksin A üretim miktarları Şekil 4.5'te verilmiştir. 8-04D2 nolu izolatın en fazla miktarda okratoksin A ürettiği sıcaklık 15°C'dir (ortalama 11,012 µg/g). En düşük düzeyde OTA ürettiği sıcaklık ise 0,008 µg/g ile 40°C'dir. 21-04D1 nolu *Aspergillus carbonarius* izolatı en yüksek OTA'yı 1,25 µg/g'lık ortalama ile 20°C'de üretirken en düşük OTA'yı 0,03

µg/g'lik ortalama ile 35°C'de üretmiştir. İncelenen izolatlar içerisinden en yüksek ortalama OTA üretim miktarına sahip izolat olan 46D2 nolu *A. carbonarius* izolatı 11,94 µg/g'lık ortalama ile en yüksek OTA üretimini 20°C'de gerçekleştirirken, en düşük üretimi 0,57 µg/g'lik ortalama ile 30°C'de gerçekleştirmiştir. 6Y1 nolu *A. niger* agg. izolatı ise en yüksek düzeyde OTA üretimini 25°C'de, en düşük düzeyede OTA üretimini ise 15°C'de gerçekleştirmiştir. Şekilden görüldüğü gibi *Aspergillus carbonarius* için maksimum OTA üretiminin 15-20°C'de, *Aspergillus niger* agg. için ise 25-30°C'de gerçekleştiği bulunmuştur.



Şekil 4.5 : İzolatların ortalama OTA üretim miktarları.

Belli ve diğ. (2005), sentetik üzüm besiyerinde *Aspergillus carbonarius*'un OTA üretimine çevresel faktörlerin etkisini 15-37°C aralığında 5 farklı sıcaklıkta incelemişlerdir. Maksimum OTA üretiminin 20°C'de olduğunu belirtmişlerdir. Benzer olarak gerçekleştirilen çalışmada A. carbonarius 21-04D1 ve 46D2 izolatları da maksimum OTA üretimini 20°C'de gerçekleştirmiştir. En düşük düzeyde OTA'nın ise 30, 35 ve 37°C'de üretildiğini ve istatistiksel olarak bu üç sıcaklık arasında önemli bir farklılık olmadığını ifade etmişlerdir.

Leong ve diğ. (2006), sentetik üzüm suyu besiyerinde (SGM), *A. carbonarius* için en yüksek OTA üretimini 15°C'de 21 µg/g düzeyinde gözlemişlerdir, en düşük seviyede OTA üretimi ise 30°C'de görülmüştür. *A. niger* için ise en yüksek OTA üretimini 15°C'de 15 µg/g olarak belirtilmiştir.

Astoreca ve diğ. (2009), *Aspergillus niger* agg. üyelerin OTA üretimine sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Çalışılan sıcaklıklar arasında maksimum düzeyde OTA 25°C'de, minimum düzeyde OTA'yı ise 15°C saptanmıştır. Astoreca ve diğ. (2009)'a benzer olarak gerçekleştirilen çalışmada da *A. niger* agg. maksimum OTA üretimini 25°C'de, minimum 15°C'de gerçekleşmiştir.

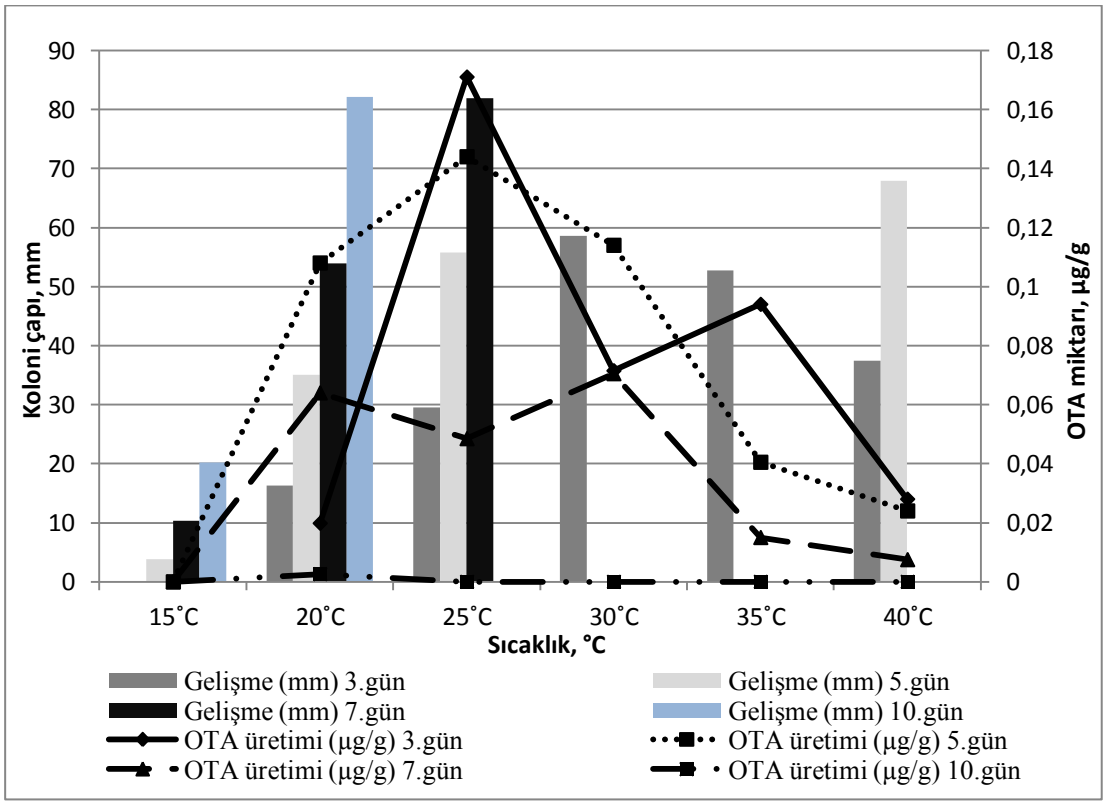
4.4 *Aspergillus* section *Nigri* Üyesi Küflerin Gelişme ve OTA Üretimleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi

Şekil 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9'da *Aspergillus* section *Nigri* üyelesi 3 adet *Aspergillus carbonarius* ve 1 adet *A. niger* izolatının koloni çapı ve okratoksin A üretimleri arasında ki ilişki verilmiştir. Şekil 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9 incelendiğinde OTA üretimlerinin gelişme ile doğru orantılı olmadığı görülmektedir. 8-04D2 nolu *Aspergillus carbonarius* izolatının en hızlı geliştiği sıcaklık 20°C olduğu halde optimum OTA üretimi 15°C'de gerçekleşmiştir. 21-04D2 nolu *A. carbonarius* izolatı ise en hızlı 25°C'de gelişirken maksimum OTA üretimi 20°C'de gerçekleşmektedir. Benzer olarak *A. carbonarius* 46D2 izolatı gelişme ve OTA üretimi açısından paralellik göstermemektedir. Optimum gelişme sıcaklığı 25°C iken OTA üretimi en fazla 20°C'dedir. 6Y1 nolu *Aspergillus niger agg.* izolatı ise en hızlı gelişmeyi 30°C'de gösterirken, optimum OTA üretimini ise *A. carbonarius* izolatlarına oranla çok düşük miktarda olmakla birlikte 25°C'de gerçekleştirmiştir.

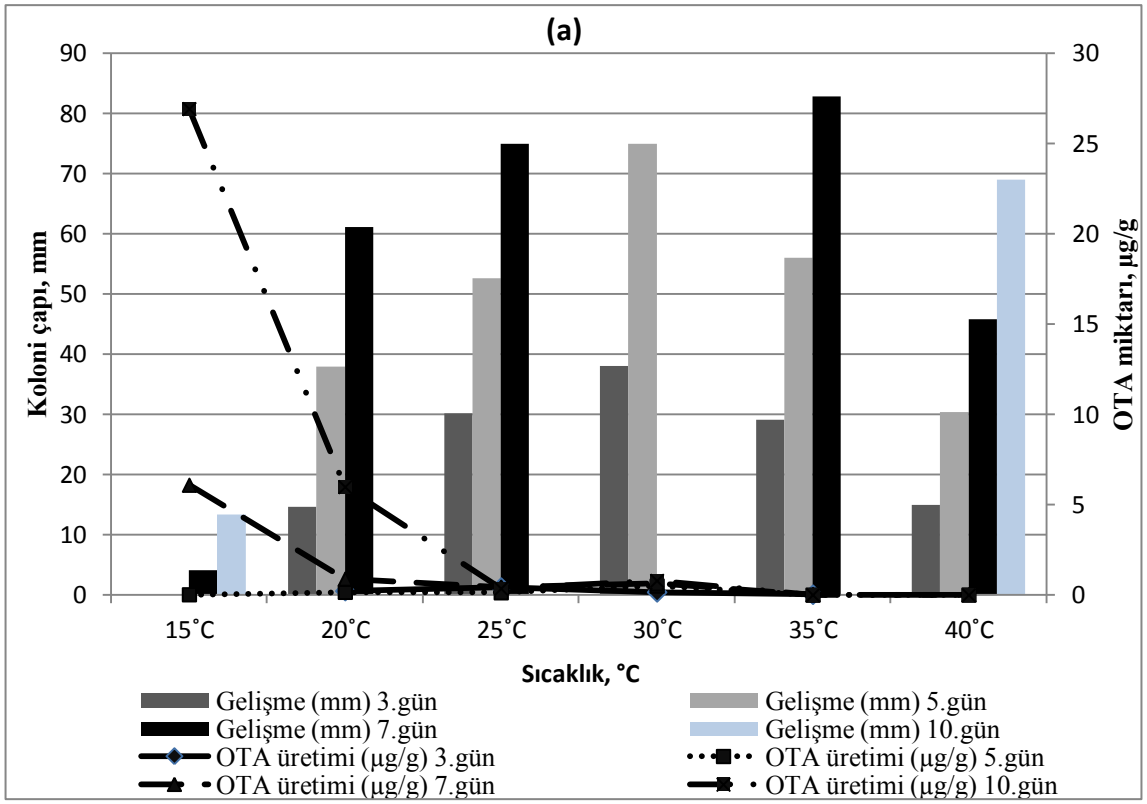
Lasram ve diğ. (2010) yaptıkları çalışmada Tunus üzümlerinden elde edilen *Aspergillus carbonarius*'un gelişme ve okratoksin A üretme potansiyellerine sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Gelişme için optimum sıcaklığın 30°C olduğu, en yüksek toksin üretiminin 15-25°C aralığında gerçekleştiği bildirilmiştir.

Aspergillus carbonarius'un gelişme ve OTA üretimine sıcaklık ve su aktivitesine etkisinin yapay üzüm suyu besiyerinde incelendiği çalışmada izolatların genel olarak 10°C ve 40°C'de gelişmediği tespit edilmiştir (Tassou ve diğ., 2009).

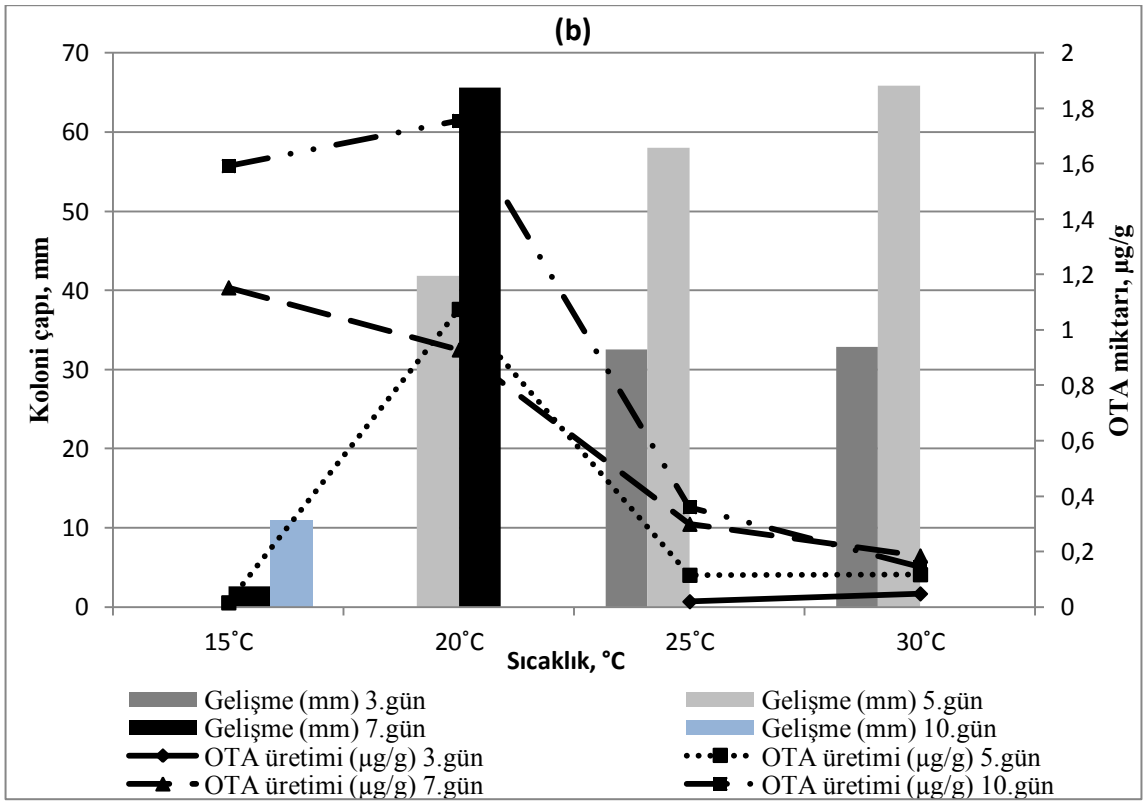
Siyah aspergillilerin gelişme ve OTA üretimine sıcaklığın etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, siyah aspergililerin maksimum OTA üretim seviyelerine PDA besiyerinde 25°C ve 5. günde ulaşıldığı bildirilmiştr. Çalışmada *A. carbonarius* için optimum gelişme 30°C'de iken optimum OTA üretimi 20°C'de gerçekleşmiştir. Gelişme sıcaklıkla birlikte artarken buna zıt olarak OTA üretimi sıcaklık artışına bağlı olarak azalmıştır. Çalışmada kullanılan 42 adet *A. niger* agg. izolatından 25 adeti OTA üretirken miktarı *A. cabonari*us'a göre düşük olmakla birlikte 0.1-37.12 ng/g aralığındadır (Techarat ve diğ., 2012).



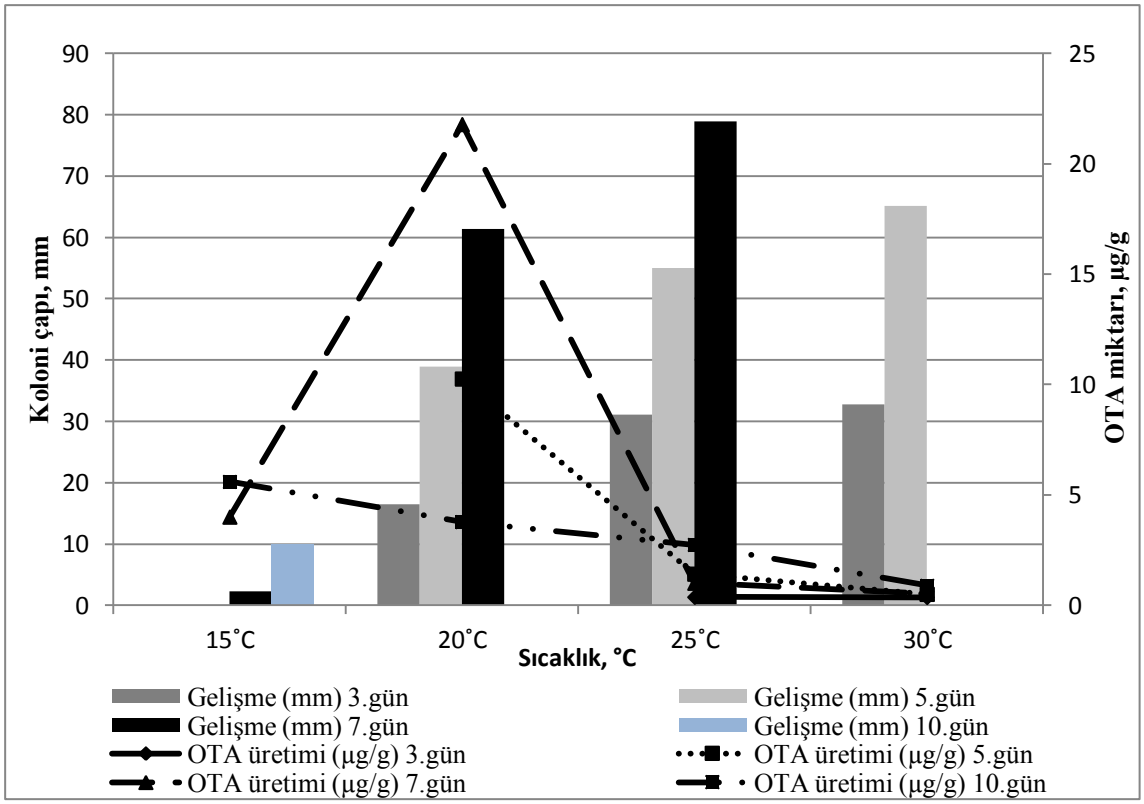
Şekil 4.6 : *Aspergillus niger* 6Y1 nolu izolatın gelişme ve OTA üretimi arasındaki ilişki.



Şekil 4.7 : *Aspergillus carbonarius* 8-04D2 nolu izolatın gelişme ve OTA üretimleri arasındaki ilişki



Şekil 4.8 : *Aspergillus carbonarius* 21-04D1 nolu izolatın gelişme ve OTA üretimleri arasındaki ilişki.



Şekil 4.9 : *Aspergillus carbonarius* 46D2 nolu izolatın gelişme ve OTA üretimi arasındaki ilişki.

Marin ve diğ. (2006), sentetik üzüm besiyerinde *Aspergillus carbonarius*'un *o*kratoksin A üretimini araştırdıkları çalışmada en fazla OTA üretiminin 20°C'de gerçekleştiğini, ve bunu sırasıyla 25, 15, 30 ve 35°C'nin takip ettğini ifade etmişlerdir. Çalışmada gelişmenin optimum olduğu 35°C'de OTA üretimine nadiren rastlanmıştır.

Esteban ve diğ. (2004), *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin okratoksin A üretimine sıcaklığın etkisini inceledikleri çalışmada izolatların OTA üretimi gerçekleştirdikleri sıcaklığın gelişmeleri için uygun olan sıcaklık aralığına göre daha dar olduğunu belirtmişlerdir.

Gerçekleştirilen çalışmada ise *A. carbonarius* izolatlarında gelişmenin gözlendiği tüm koşullarda OTA üretimi tespit edilmiştir. Esteban ve diğ. (2004), *A. niger* izolatları için optimum OTA üretim sıcaklıklarının optimum gelişmenin olduğu sıcaklıktan daha düşük olduğu belirtmişlerdir. 6Y1 nolu *Aspergillus niger agg.* izolatı da en hızlı gelişmeyi 30°'de gösterirken, optimum OTA üretimini 25°C'de gerçekleştirmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Ege Bölgesi'nden temin edilen kuru incirlerden izole edilen 30 adet *Aspergillus* section *Nigri* (10 adet *A. carbonarius*, 20 adet *A. niger* aggregate) izolatının 25 ve 30°C'de OTA üretme potansiyelleri incelenmiştir. İnceleme sonucunda bu sıcaklıklarda OTA üretimleri dikkate alınarak 3 adet *Aspergillus carbonarius* ve 1 adet *Aspergillus niger* agg. izolatı seçilmiştir. Seçilen izolatların gelişme ve OTA üretimine sıcaklığın etkisi 8 farklı sıcaklıkta (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C) katı besiyerinde belirlenmiştir.

Çalışmada *A. carbonarius* izolatları CYA besiyerinde %90 oranında OTA üretirken *A. niger* agg. izolatı YES besiyerinde %45 oranında OTA üretmiştir. Çalışma sonucunda literatüre paralel olarak *A.niger* agg. izolatları , *A. carbonarius* izolatlarına oranla düşük miktarda ve sıklıkta OTA üretimi gerçekleştidiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın ikinci kısmında *Aspergillus* section *Nigri* üyesi dört izolatın gelişme ve OTA oluşturma özelliklerine sıcaklığın etkisi incelenmiştir. İzolatların tamamı 5 ve 10°C'de gelişmemiştir. *A.carbonarius* izolatlarından 8-04D2 nolu izolat 15-40°C, 21-04D1 ve 46D2 nolu izolatlar ise 15-30°C arasında gelişmiştir. *Aspergillus niger* izolatı ise 15-40°C arasında gelişme göstermiştir. *A. carbonarius* izolatları için optimum gelişme sıcaklığı 30°C'dedir. *A. niger* agg. izolatı ise 30°C'de optimum gelişmekle birlikte 30 ve 35°C ile arasında α=0,05 önem düzeyinde istatistiksel bir fark bulunmamıştır İzolatların tamamının en yavaş geliştiği sıcaklık 15°C'dir. 30°C'de en hızlı gelişen izolat, günde 25,968 mm gelişen 6Y1 nolu *Aspergillus niger* agg. ve en yavaş gelişen izolatın günde 16,152 mm gelişen 46D2 nolu *Aspergillus carbonarius*'dur. Çalışmada kullanılan bütün izolatlar için de en uzun lag fazı süresi 15°C'dedir. Bu sıcaklıkta en uzun lag fazı süresi 8 gün ile 46D2 nolu *Aspergillus carbonarius* izolatına aittir. *A. carbonarius* izolatları için en kısa lag fazı 25°C'dedir. *A. niger* agg. izolatı için ise en kısa lag fazı süresinin *A. carbonarius* izolatlarından farklı olarak 40°C'de olduğu saptanmıştır. *A. carbonarius* izolatları gelişmenin gözlendiği her sıcaklık ve sürede OTA üretmektedir. Çalışmada 8-04D2 nolu

Aspergillus carbonarius izolatının optimum OTA üretimi 15°C'de, 21-04D1 ve 46D2 izolatlarının OTA üretimi en fazla 20°C'de gerçekleşmiştir. 6Y1 nolu *Aspergillus niger agg.* izolatının optimum OTA üretimi ise *A.carbonarius* izolatlarına oranla çok düşük miktarda olmakla birlikte 25°C'de gerçekleştirmiştir. *A. niger* agg. izolatlarının oluşturduğu toksin miktarı güne bağlı olarak azalma eğilimi gösterirken 20°C hariç çalışılan tüm sıcaklıklarda 10. günde toksin tespit edilmemiştir.

Kuru incirinde dahil olduğu kuru meyvelerde hakim florayı *A.* section *Nigri* üyesi küfler oluşturmaktadır. *A.* section *Nigri* üyelerinin potansiyel OTA üreticisi olduklarının bilinmesi bu grup üyelerinin incirde varlığının önemini arttırmıştır.

Bu kapsamda *A.* section *Nigri* grubuna dahil küflerin optimum gelişme, OTA üretim sıcaklıklarının belirlenmesi ve gelişmeleri ile optimum OTA üretiminin ilişkilendirilmesi önem taşımaktadır. Küf gelişmesi ve OTA üretimi için optimum koşulların belirlenmesi incirin kurutulması ve daha sonraki aşamalarda mikotoksin oluşumunun kontrolüne olanak sağlayabilir.

Aspergillus section *Nigri* üyesi küfler kuru meyvelerde hakim florayı oluşturmaktadır. *A. section* Nigri üyelerinin OTA üretme potansiyellerinin belirlenmesinden sonra gıdalardaki varlığı önem kazanmıştır.

Çalışma bulgularına göre *A. carbonarius* üyelerinnin daha yüksek miktarda ve sıcaklıkta OTA üreticisi olmaları nedeniyle incirde OTA varlığından asıl sorumlu küf oldukları düşünülmektedir. Bununla birlikte incirde daha sık rastlanan *A. niger* izolatları da düşük miktarda ve sıklıkta OTA üreticisidir.

KAYNAKLAR

Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J. and Cabanes, F. J. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek,* 86, 33–49.

Aish, J. L., Rippon, E. H., Barlow, T. and Hattersley, S. J. (2004). Ochratoxin A, in Mycotoxsins in food: detection and control, 307-338, Eds. Magan, N., Olsen, M., Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England.

Aksoy, U., Sabır, E., Eltem, R., Kıraç, S., Sarıgül, N., Meyveci, B. K. ve Ateş, M. (2003). Kuru İncirlerde Okratoksin A'nın Potansiyel Kontaminasyon Riskinin Araştırılması, *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*, 18-19 Eylül, İstanbul, 41- 47.

Alborch, L., Bragulat, M. R., Abarca, M. L. Cabanes, F. J. (2011). Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels, *International Journal of Food Microbiology*, 147 : 53-57.

Amezqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Murillo, M., Lopez de Cerain, A. (2005). Occurance of ochrztoxin A in cocoa beans: Effect of shelling, *Food Additives and Contaminanats*, 22, 590-596.

Amezqueta, S., Gonzalez-Penas, E. , Dachoupakan, C., Murillo-Arbizu, S., Lopez de Cerain, A., Guraud, J. P. (2008). OTA-producing fungi isolated from stored cocoa beans. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 197–201.

Amezqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., Gonzalez-Penas, E., Lopez de Cerain, A., Guiraud, J. P. (2012). OTA-producing fungi in foodstuf: A review, *Food Control*, 26: 259-268.

Anlı, E., Çabuk, B., Vural, N. and Başpınar, E. (2005). Ochratoxin A in Turkish wines, *Journal of Food Biochemistry* 29, 611–623.

Anonim, (1995). Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO Technical Report Series, 859).

Anonim, (2002). Survey of nuts, nut products and dried tree fruits for mycotoxins. http://www.food.gov.uk/science/surveillance/, alındığı tarih: 22. 01.2012.

Astoreca, A., Magnoli, C., Ramirez, M. L., Combina, M., Dalcero, A. (2007). Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina, *International Journal of Food Microbiology*, 119:314–318.

Astoreca, A., Barberis, C., Magnoli, C., Combina, M., Dalcero, A. (2009). Ecophysiological factors effect on growth rate, lag phase and

ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains on irradiated peanut seeds, *International Journal of Food Microbiology*,129: 131-135.

Astoreca, A. L., Barberis, C. L., Magnoli, C. E., Dalcero, A. M. (2010). *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on irradiated dried grapes under different water activity and temprature conditions, *Word Mycotoxin Journal*, Volume 3, Number 2: 175-182.

Aydın, N. (t. y.). Hayvan sağlığında mikotoksinler ve mikotoksikozisler, Konferans, AnkaraÜniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 37-46. Alındığı tarih: 12.11.2011.

Battilani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T. and Pietri, A. (2004a). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84:1736–1740.

Battilani, P., Pietri, A., and Logrieco, A. (2004b). Risk Assesment and Management in Practice: Ochratoxin in Grapes and Wine. *Mycotoxins in Food:Dedection and Control*, 244-261.

Battilani, P., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S. and Pietri, A. (2006). Black aspergilli on ochratoxin A in grapes in Italy, *International of Food Microbiology*, 111: 53-60.

Bayram, M., Anlı, E. (2008). Mikotoksinler ve Sarap,Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.

Belli, N., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J. (2002). Review: Ochratoxin A in wines, musts and grape juices: occurrence, regulations and methods of analysis. *Food Science and Technology International* 8(6), 325-335.

Belli, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. and Marin, S. (2004a). Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by Aspergillus section Nigri strains isolated from grapes, *Letters in Applied Microbiology*, 38, 72–77.

Belli, N., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J. (2004b). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes, *International Journal of Food Microbiology* 96 :19– 27.

Belli, N., Ramos, A.J., Coronas I., Sanchis, V. and Marin, S. (2005). *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors, *Journal of Applied Microbiology*, 98, 839–844.

Belli, N., Bau, M., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Minguez, S., Cabanes, F. J. (2006). Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes, *International Journal of Food Microbiology* 111 S40–S45.

Belli, N., Marin, S., Coronas, I., Sanchis, V. and Ramos, A. J. (2007). Skindamage, high temperature and relative humidity as detrimental

factors for *Aspergillus carbonarius* infection and ochratoxin A production in grapes, *Food Control* 18, 1343–1349.

Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. and Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Sept., 447–459.

Calvo, A. M. (2005). Mycotoxins. In: Toxins in Food. Eds. Dabrowski, W. M., Sikorski, Z. E. CRC Press Florida, 215-235.

Chiotta, M.L., Reynoso, M. M., Torres, A. M., Combina, M., Chulze, S. N. (2010). Molecular characterization and toxigenic profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from the main grape-growing regions in Argentina, *Journal of Applied Microbiology* 110, 445–454.

Chiott, M. L, Susca, A., Stea, G., Mule, Perrone, G., Logrieco, A., Chulze, S. N. (2011). Phylogenetic characterization and ochratoxin A – Fumonisin profile of black Aspergillus isolated from grapes in Argentina, *International Journal of Food Microbiology*,149, 171–176.

Copetti, M. V., Pereira, J. L., Iamanaka, B. T. Pitt, J. I. Taniwaki, M. H. (2010) Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing, *International Journal of Food Microbiology* Volume 143, Issues 1–2, Pages 67–70.

Covarelli, L., Beccari, G., Marini, A., Tosi, L. (2012). A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area. *Food Control*, 26, 347-356.

Creppy, E.E. (2002). Review article: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127, 19–28.

De Rossi, P., Ricelli, A., Reverberi, M., Bello, C., Fabbri, A. A., Fanelli, C., De Rossi, A., Corradini, D., Nicoletti, I. (2012). Grape variety related trans-resveratrol induction affects *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* (yayında).

Duarte, S. C., Pena, A., Lino, C. M. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products, *Food Microbiology*, Volume 27, Issue 2, Pages 187–198.

EC (2006). Commission regulation 1881/2006 of December 19, 2006, setting maximum levels for certain contaminanatsin foodstuff, *Official Journal European Community*, 364, 16.

EC (2010). Commission regulation 1881/2006 of February 5, 2010, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A, *Official Journal European Union*, L 35/8.

EFSA (2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission releated to ochratoxin A in food. *The EFSA Journal*, 365, 1 – 56.

EHC, (2012). Enviromentel Health Criteria 11, İnternational Programme on Chemical Safety, Mycotoxins**,**

http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm, alındığı tarih: 10.02.2012.

Eltem, R., Taşkın, E. (2005). *Aspergillus* section *Nigri*'nin Filogenetik Taksonomisi, Türkiye'de Mikotoksin Çalışmaları,. *II Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Bildiriler Kitabı*, 48-54. Edts. Heperkan, D., Kaya, G. D., Güler, F. K., İstanbul Teknik Üniversitesi, Türkiye (23-24 Mayıs 2005).

Erzurum, K. (2001). Gıdalarda mikotoksin oluşumunu etkileyen faktöreler. *Gıda*, 26(4), 289-293.

Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J. (2004). Effects of temprature and incubation time on production of ochratoxin A bu black aspergilli, *Research in Microbiology*, 155, 861-866.

Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J. (2006). Influence of water activity and temprature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes, *Food Microbiology*, 23, 634-640.

Favilla, M., Pascale, M., Ricelli, A., Evidente, A., Amalfitano, C., Altomare, C. (2008). Inhibition of species of the *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A production in grapes by fusapyrone, *Applied an Enviroemntal Microbiology* Volume 74, No 7, 2248–2253.

Fernane, F., Sanchis, V., Marín, S., Ramos, A. J. (2010). First report on mould and mycotoxin contamination of pistachios sampled in Algeria. *Mycopathologia*, 170, 42:429.

Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., Thrane, U. (2007). Fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger*, J. Agric. Food Chem. 55, 9727–9732.

Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R. A., Neilsen, K. F. (2011). Fumonisin and Ochratoxin Production in Industrial *Aspergillus niger* strains, Volume 6, Issue, 8. Alındığı tarih: 01.04.2012, www.plosone.org.

Gaina, B., Sturza, R., Bejan, V., Bodean, C. (2009). The Content of Ochratoxin A in Moldavian wine Products, Chemistry Journal of Moldova. *General, Industrial and Ecological Chemistry*, 4 (2), 44-49.

Gil-Serna, J., Vazquez, C., Sardinas, N., Gonzalez-Jaen, M. T., Patino, B. (2011). Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, 22, 343-345.

Giray, B., Erkekoğlu, P., Sabuncuoğlu, S. Aydın, S., Şahin, G. (2011). Geriatrik popülasyonda serum okratoksin A düzeyleri, Marmara Eczacılık Dergisi 15:69-74.

Gonzales-Osyana, L., Soriano, J. M. Molto, J. C., Manes, J. (2008). Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin A in bovine milk, *Food Chemistry* 108, 272–276.

Grazioli, B., Galli, R., Fumi, M. D., Silva, A. (2006). Influence of winemaking on ochratoxin A content in red wines, in *Mycotoxins and Phytoxins, Advances in determination, toxicology and exposure management*,

271-277. Eds. Njapau, H., Trjiolo, S., van Egmond, H. P., Park, D. L., Wageningen Academic Publishers, Utrecht, Netherlands.

Hassan, Z., Khan M, Z. Khan, A. Javed, J. (2010). Pathological Responses of White Leghorn Breeder Hens Kept on Ochratoxin A Contaminated Feed. *Pakistan Veterinary Journal*, 30(2): 118-123.

Hayat, A., Nathalie, A. N., Rhouati A., Marty, J., Barthelmebs, L. (2012). Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. *Food Control* 26 401-415.

Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Vicente, E. and Menezes H. (2006). Fungi producing ochratoxin in dried fruits. *Advanced in Experimental Medicine and Biology*, 571, 181-188.

IARC. (1993). International Agency for Research on Cancer, 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human: Some Naturally Occurring Substances; Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, vol. 56. Lyon, France, pp. 489–521.

Kapetanakou, A. E., Panagou, E. Z., Gialitak, M., Eleftherios, İ., Drosinos, H., Skandamis, P. N. (2009). Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins, *Food Control*, 20:725-732.

Karabulut, Ö. A. ve Değirmencioğlu, T. (2002). Hayvan Yemi Olarak Kullanılan Buğday Danelerinde Toksin Oluşumuna Neden Olan Fungusların Sodyum Hidroksit Uygulamasıyla Engellenmesi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 16, 129-138.

Karbancıoğlu-Güler, F. (2008). İncirde Okratoksin A ve fumonisin oluşumunun incelenmesi. Doktora Tezi. İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.

Karbancıoğlu-Güler, F., **Heperkan, D.** (2008). Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs, *Analytica Chimica Acta*, 617, 32-36.

Khoury, A. E., Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status, *Toxins*, *2*(4), 461-493.

Krska R. and Molinelli, A. (2007). Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 145–148.

Lasram, S., Belli, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V., Ghorbel, A. (2007). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. International Journal of Food Microbiology, 114, 376-379.

Lasram, S., Oueslati, S., Valero, A., Marin, S., Ghorbel, A. and Sanchis, V. (2010). Water Activity and Temperature Effects on Fungal Growth and Ochratoxin A Production by Ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* Isolated from Tunisian Grapes, *Journal of Food Science*, Vol. 75, Nr. 2.

Leong, S. L., Hocking, A. D., Scott, E. S. (2006). Effect of temprature and water activity on growth an ochratoxin A production by Australian

Aspergillus carbonarius and *A.niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 209-216.

Lobeau, M., De Saeger,S., Sibanda, L., Barna-Vetro and I., Van Peteghem, C. (2005). Development of a new clean-up tandem assay column for the detection of ochratoxin A in roasted coffee, *Analytica Chimica Acta*, 538, 57–61.

Logrieco, A. F., Ferracane, F., Cozzi, G., Haidukowsky, M., Susca A., Mule, G., Ritieni, A. (2011). Fumonisin B_2 by *Aspergillus niger* in the grape–wine chain: an additional potential mycotoxicological risk, *Ann Microbiol*,61:1–3.

Magan, N., Aldred, D. (2005). Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities, *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1:10–16.

Magnoli,C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcero, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina, *Letters in Applied Microbiology*, 37, 179–184.

Manssont, M., Klejnstrupt, M. L., Phippst, R. K., Neilsen, K. F., Frisvad, J. C., Gotfredsen, C. H., Larsen, T. O. (2010). Isolation and NMR Characterization of Fumonisin B_2 and a New Fumonisin B_6 from *Aspergillus niger, J. Agric. Food Chem.*, 58 (2), pp 949–953.

Marin, S., Belli, N., Lasram, S., Chebil, S., Ramos, A. J., Ghorbel, A., Sanches, V. (2006). Kinetics of Ochratoxin A Production and Accumulation by Aspergillus carbonarius on Synthetic Grape Medium at Different Temprature Levels, *Journal of Food Science*, Vol 71, Nr 6, 196-200.

Matthews, W. (2002). Survey of Nuts, Nut Products and Dried Tree Fruits for Mycotoxins.

Mitchell D., Parra, R., Aldred, D., Magan, N. (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology* 97, 439–445.

Mogensen, J. M., Nielsen, K. F., Samson, R. A., Frisvad, J. C., Ulf Thrane, U. (2009). Effect of temperature and water activity on the production of fumonisins by *Aspergillus niger* and different *Fusarium* species, *BMC Microbiology*, 9:281, 1-12.

Moslem, M. A., Mashraqi, A., Abd-Elsalam, K. A., Bahkali, A. H. ve Elnagaer, M. A. (2010). Molecular detection of ochratoxigenic Aspergillus species isolated from coffee beans in Saudi Arabia, *Genetics and Molecular Research* 9 (4): 2292-2299.

Nielsen, K. F., Mogensen, J. M., Johansen, M., Larsen, T. O., Frisvad, J. C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger group, Anal Bioanal Chem,395:1225–1242*.

Nizamlıoğlu, N. M., Çon, A. H. (2010). Gıda ve Yemlerde Önemli Mikotoksinler: Sitrinin, Sitreoviridin ve Sterigmatosistin, *Akademik Gıda* 8(5), 29-36.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvadi J. C., Samson, R. A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand, *International Journal of Food microbiology*, volume 128:2, 197-202.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvadi J. C., Samson, R. A. (2009). Fumonisin B_2 production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans, *Food Additives and Contaminants* Vol. 26, No. 1, 94–100.

O'Brien, E., and Dietrich D. R. (2005). Ochratoxin A: The Continuing Enigma. *Critical Reviews in Toxicology,* 35, 33–60.

Oueslati, S., Lasram, S., Ramos, A. J., Marin, S., Mliki, A., Sanchis, V., Ghorbel, A. (2010). Alternating tempratures and photoperiod effects on fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 210-213.

Palacias-Cabrera, H., Taniwaki, M. H., Hashimito, J. M., Casttle de Menezes, H. (2005). Growth of *Aspergillus ochraceus, A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and tempratures. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36:24-28.

Palencia, E. R., Hinton, D. M., Bacon, C. W. (2010) The Black *Aspergillus* Species of Maize and Peanuts and Their Potential for Mycotoxin Production, Toxins 1, 399-416.

Pardo, E., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2004). Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by Aspergillus ochraceus on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity, *International Journal of Food Microbiology*, 95 : 79– 88.

Pardo, E., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marin, S. (2005). Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium, *International Journal of Food Microbiology* 98, 1 – 9.

Patharajan, S., Karthikeyan, V., Reddy, K. R. N., Spadaro, D. (2011).Potential of Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes at different enviromental factors, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, Volume 44, No 18, 1802- 1814.

Petzinger, E., Ziegler, K., (2000). Ochratoxin A from a Toxicological Perspective. *J. Vet. Pharmacol. Therap*, 23:91-98.

Pitt, J.I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56: 1 184-192.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). Fungi and Food Spoilage. 3rd edition, *Springer Dordrecht Heidelberg*, London, New York.

Pohland, A. E., Nesheim, S., Friedman, L. (1992). Ochratoxin A: A Review. *International Union of Pure and Appplied Chemistry*, Vol:64, No:7, 1029-1046.

Remiro, R., González-Peñas, E., Lizarraga, E., López de Cerain, A. (2012). Quantification of ochratoxin A and five analogs in Navarra red wines, *Food Control* 27, 139-145.

Romero, S. M., Patriarco, A., Fernandez Pinto, V. and Vaamonde, G. (2007). Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits, *International Journal of Food Microbiology* 115, 140–143.

Romero, S. M., Fernandez Pinto, V., Patriarco, A., and Vaamonde, G. (2010). Ochratoxin A production by mixed inoculum of Aspergillus carbonarius at different conditions of water activity and temprature, *International Journal of Food Microbiology,* 140:277-281.

Sabuncuoğlu-Atasayar, Baydar, S. T., Giray, B., Şahin, G. (2008). Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması, Hacettepe Üniversitesi, *Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28:1, 63-92.

Samson, R. A., Houbraken J. A. M. P., Angelina, Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M., Frisvad, J. C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*, *Studies in Mycology*, 50: 45–61.

Samson, R. A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J. C, Varga. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli, *Studies in Mycology*, 59: 129–145.

Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R., Sánches-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A,*Neuro Toxicology*, 27:1, 82-92.

SCOOP. (2002). Report of experts participating in Task 3.2.7 Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States, Reports on tasks for scientific cooperation, Directorate-General Health and Consumer Protection, Rome, Italy, http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf.

Scott, P.M. (2002). Methods of analysis for ochratoxin A, in *Mycotoxins and Food Safety* 117-134. Eds. DeVeries, J.W., Trucksess, M.W., Jackson, L.S., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Spadaro, D., Patharajan, S., Lore, A., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2010). Effect of pH, water activity and temperature on the growth and accumulation of ochratoxin A produced by three strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Italian vineyards, *Phytopathol. Mediterr*. 49, 65–73

Şeviktürk, İ. M., Gönülalan, Z. (2007). Kayseri'de tüketime sunulan bazı tahıl üreünlerinde okratoksin A miktarları, *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 16:2, 86-90.*

Tassou, C.C., Natskoulis, P.I., Magan, N. and Panagou, E.Z. (2009). Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production

boundaries of two *Aspergillus carbonarius* isolates on a simulated grape juice medium, *Journal of Applied Microbiology* 107, 257–268.

Techarat S. ve Dachoupakan, C. (2012). Growth and Ochratoxin A production of black aspergilli isolated from Thai wine grapes. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 5(03) : 172-182**.**

TGK (2011). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. Yayımlandığı Resmi Gazete, 29.12.2011-28157.

Van der Stegen, G. H. D., Essens, J. M., van der Lijn, J. (2001). Effects of Roasting Conditions on Reduction of Ochratoxin A in Coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4713-4715.

Varga, J. and Kozakiewicz, Z. (2006). Ochratoxin A in grapes and grape derived products. Trends in Food Science & Technology 17 , 72–81.

Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., Samson, R. A. (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*, *Studies in Mycology* 69: 1.

Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2005). Ochratoxin A producing species in grapes and sun dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 196-201.

Veldman, B. (2004). Mycotoxins in the Animal Production Chain. In: Meeting te Mycotoxin Menace. Eds. Barug D., van Egmond, H., Lopez-Garcia, R., van Osenbruggen, T., Visconti, A. Wagebingen Academic Publishers, Nerherlands.

Visconti, A., De Girolamo, A. (2005). Fitness for purpose – Ochratoxin A analytical developments, *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 37–44.

Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M. (2008). Managing ochratoxin A risk in the grape wine food chain, *Food Additives and Contaminants* 25 : 193-202.

Wood, G. E, Trucksess, M. W., Henry, S. H. (2003). Major Fungal Toxins of Regulatory Corcern. In: Interantional Handbook of Foodborne Pathogens. Eds. Miliotis, M. D., Bier, J. W. Marcel Dekker Inc., New York, US., 428-430.

Yıldız, G. (2009). Türkye'de 2001-2004 Yıllarında Hayvancılık işletmelerinde kullanılan kaba emlerde Aflatoksin, zearalenon ve Okratoksin A kirliliği. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg*., 49 (2): 113-124.

Ziedine, A., Soriano, J.M., Juan, C., Mojemmı, M., Molto, J.C., Bouklouze, A., Cherrah, Y., Idrissi,L., El Aouad, R., Manes, J. (2007). Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Sale´area, Morocco, *Food Additives and Contaminants*, 24(3): 285–291.

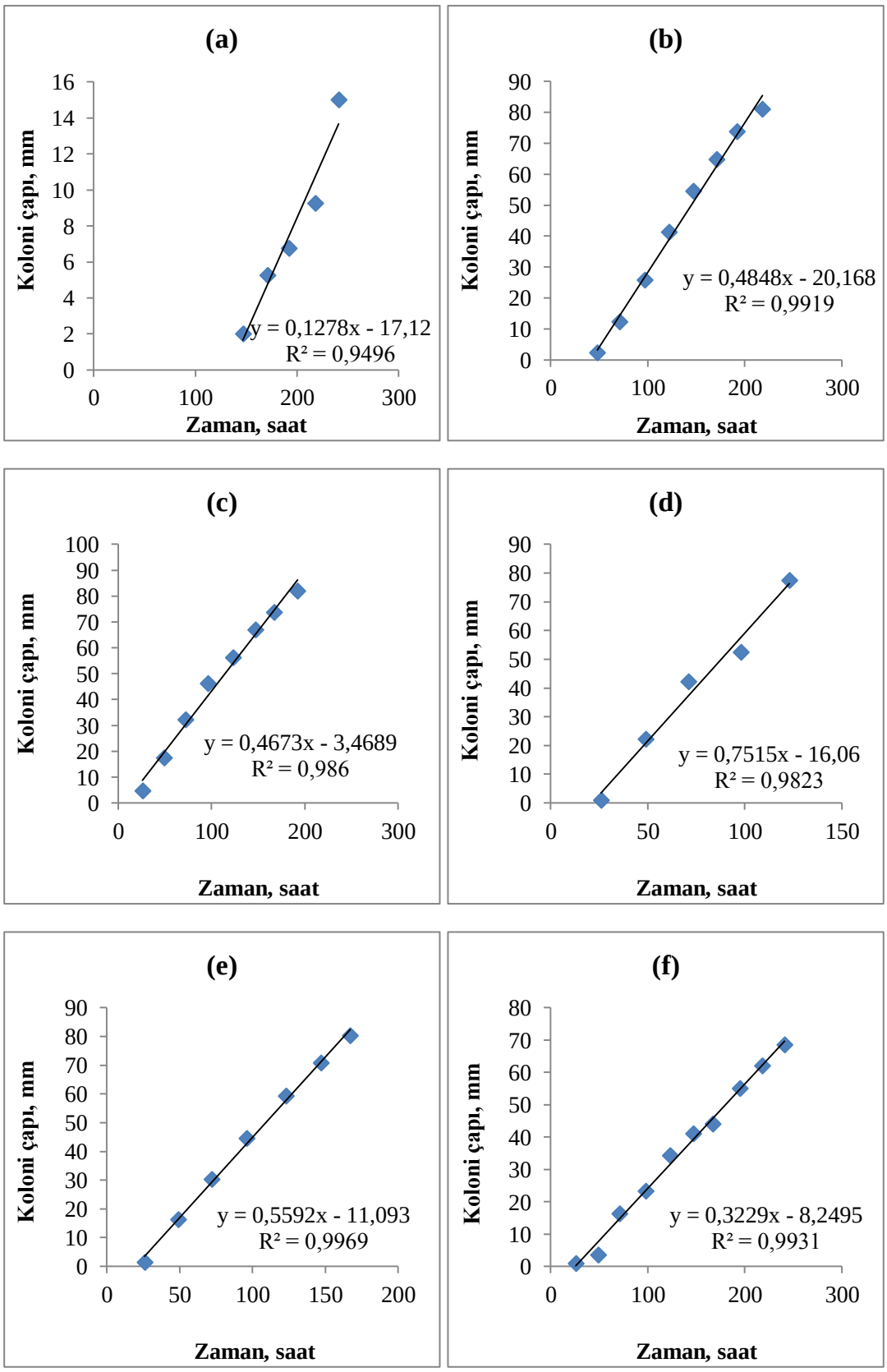
EKLER

EK A: İzolatların Gelişme Eğrileri.

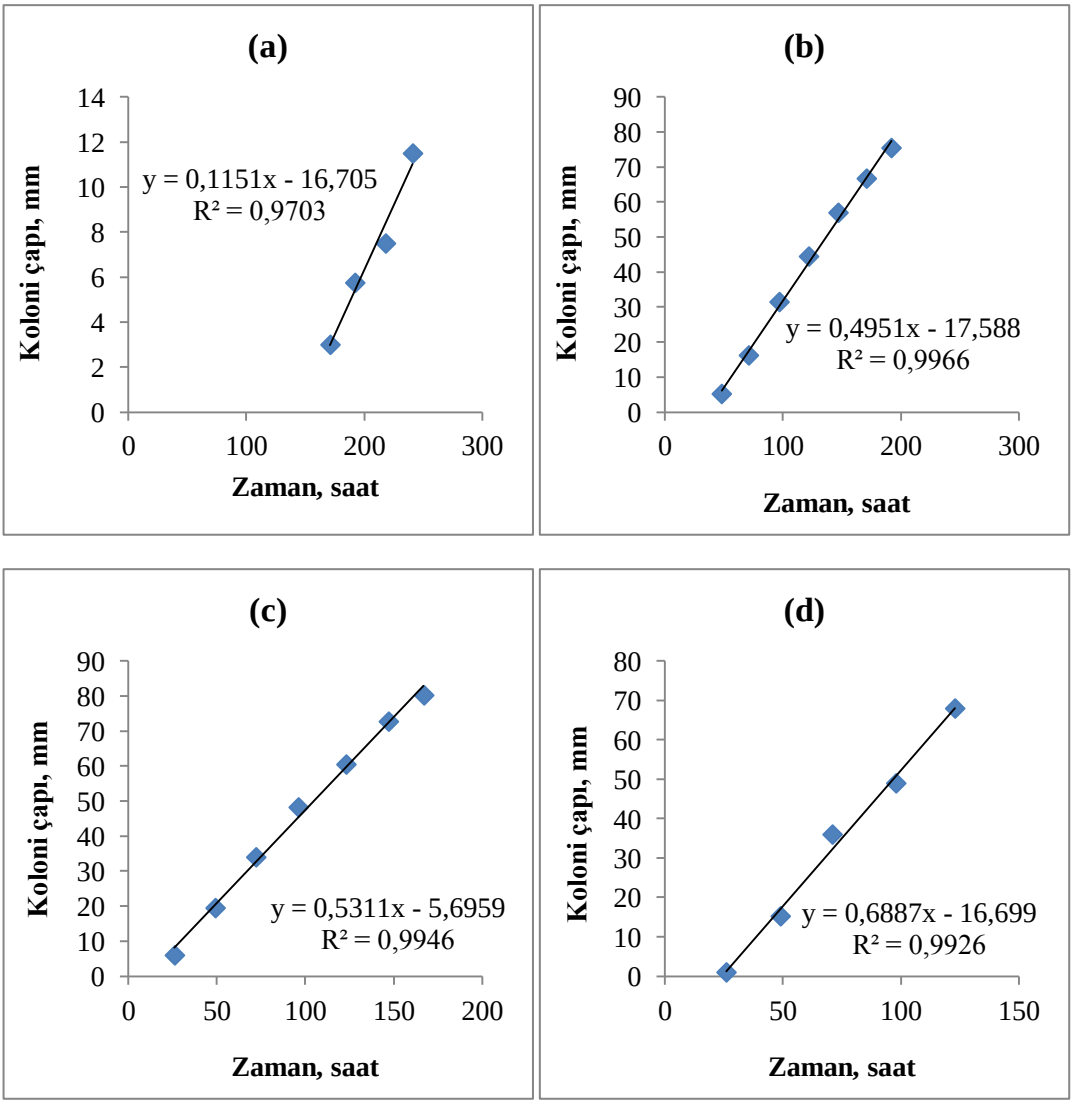
EK B: Varyans Analiz Çizelgeleri.

EK C: Yüksek Basınçlı Sıvı Kramatografisi Sonuç Kromatogramları Örnekleri.

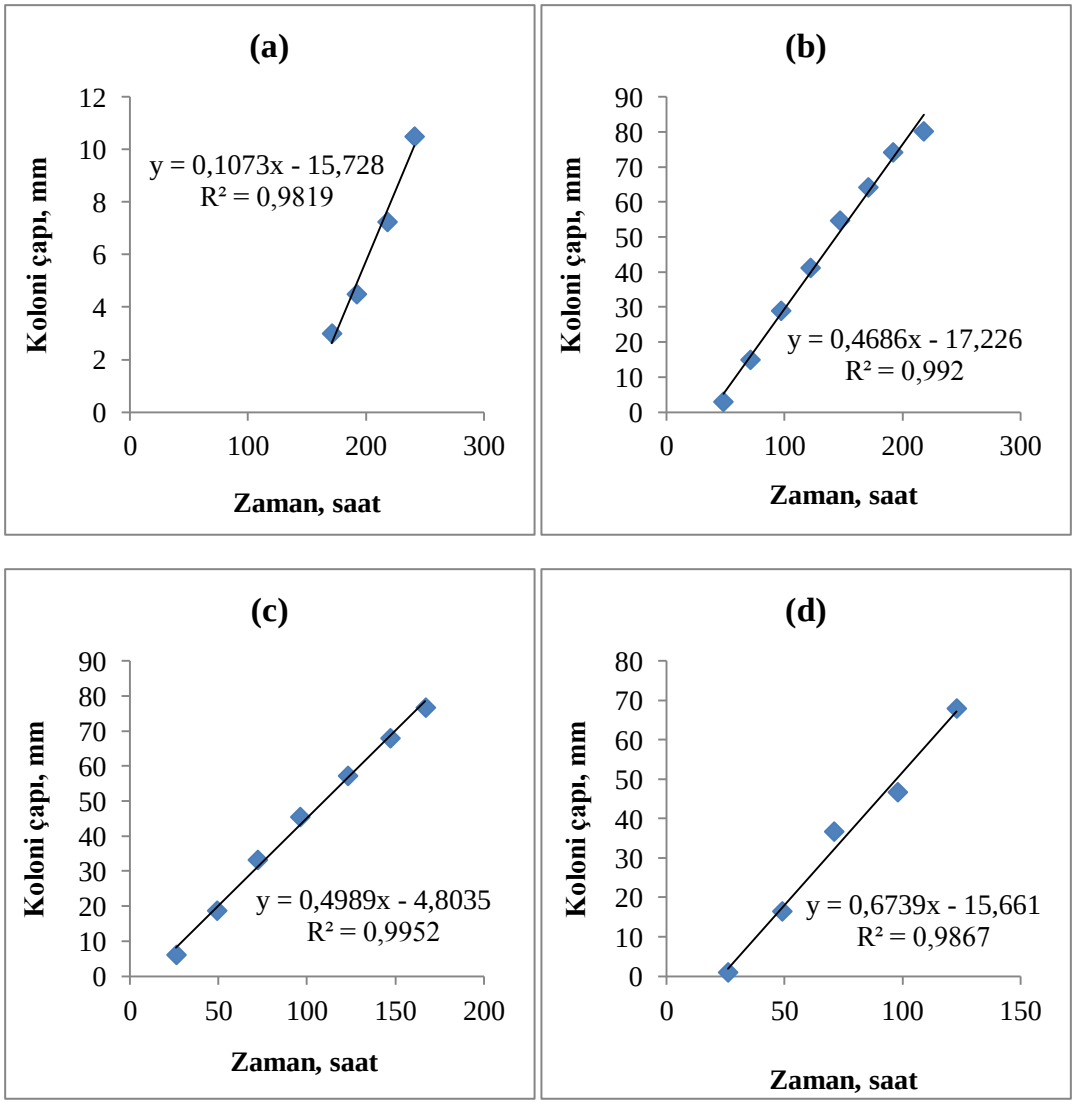
EK A: İzolatların Gelişme Eğrileri



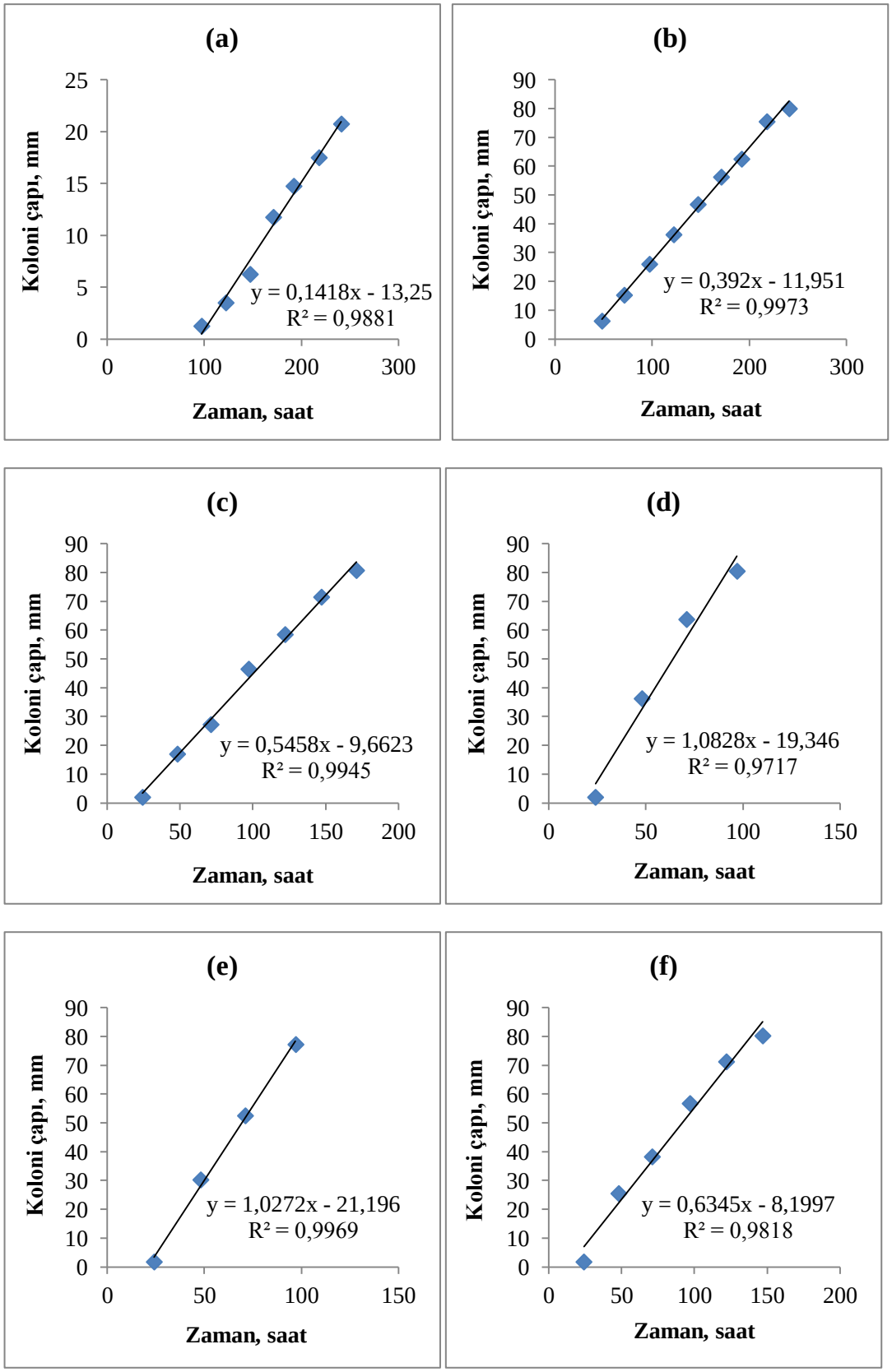
Şekil A.1 : 8-04D2 izolatının gelişme eğrileri a. 15°C b. 20°C c. 25°C d. 30°C e. 35°C f. 40°C.



Şekil A.2 : 21-04D1 izolatının gelişme eğrileri a. 15°C b. 20°C c. 25°C d. 30°C.



Şekil A. 3 : 46D2 izolatının gelişme eğrileri a. 15°C b. 20°C c. 25°C d. 30°C .



Şekil A.4 : 6Y1 izolatının gelişme eğrileri a. 15°C b. 20°C c. 25°C d. 30°C e. 35°C f. 40°C.

EK B: Varyans Analiz Çizelgeleri

Çizelge B.1 : *A. carbonarius* 8-04D2 izolatının OTA üretimine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Gün	3	234,42	68,54	2,17	0,109
Sıcaklık	5	553,35	110,67	3,51	0,011
Hata	35	1103,87	31,54		
Toplam	43	1891,63			

Çizelge B.2 : *A. carbonarius* 21-04D1 izolatının OTA üretimine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Gün	3	1,9109	0,8573	5,24	0,006
Sıcaklık	4	6,3253	1,5813	9,66	0,000
Hata	26	4,2558	0,1637		
Toplam	33	12,4920			

Çizelge B.3 : *A. carbonarius* 46D2 izolatının OTA üretimine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Gün	3	121,00	19,21	1,17	0,348
Sıcaklık	3	465,78	155,26	9,43	0,000
Hata	19	312,78	16,46		
Toplam	25	899,57			

Çizelge B.4 : *A. niger*agg. 6Y1 izolatının OTA üretimine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Gün	3	0,043	0,013	12,37	0,000
Sıcaklık	5	0,035	0,007	6,87	0,000
Hata	37	0,038	0,001		
Toplam	45	0,116			

Çizelge B.5 : *A. carbonarius* 8-04D2 izolatının gelişmesine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Sıcaklık	5	261,657	52,331	597,72	0,000
Hata	6	0,525	0,088		
Toplam	11	262,183			

Çizelge B.6 : *A. carbonarius* 21-04D1 izolatının gelişmesine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Sıcaklık	3	205,242	68,414	630,52	0,000
Hata	4	0,434	0,109		
Toplam	7	205,676			

Çizelge B.7 : *A. carbonarius* 46D2 izolatının gelişmesine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Sıcaklık	3	195,280	65,093	725,62	0,000
Hata	4	0,354	0,088		
Toplam	7	195,634			

Çizelge B.8 : *A. niger* agg. 6Y1 izolatının gelişmesine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Sıcaklık	5	771,52	154,30	444,57	0,000
Hata	6	2,08	0,35		
Toplam	11	773,60			

Çizelge B.9 : *A. carbonarius* 8-04D2 izolatının lag fazı süresine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Sıcaklık	5	89,909	17,982	46,30	0,000
Hata	6	2,330	0,388		
Toplam	11	92,239			

Çizelge B.10 : *A. carbonarius* 21-04D1 izolatının lag fazı süresine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Sıcaklık	3	65,904	21,968	3283,69	0,000
Hata	4	0,027	0,007		
Toplam	7	65,930			

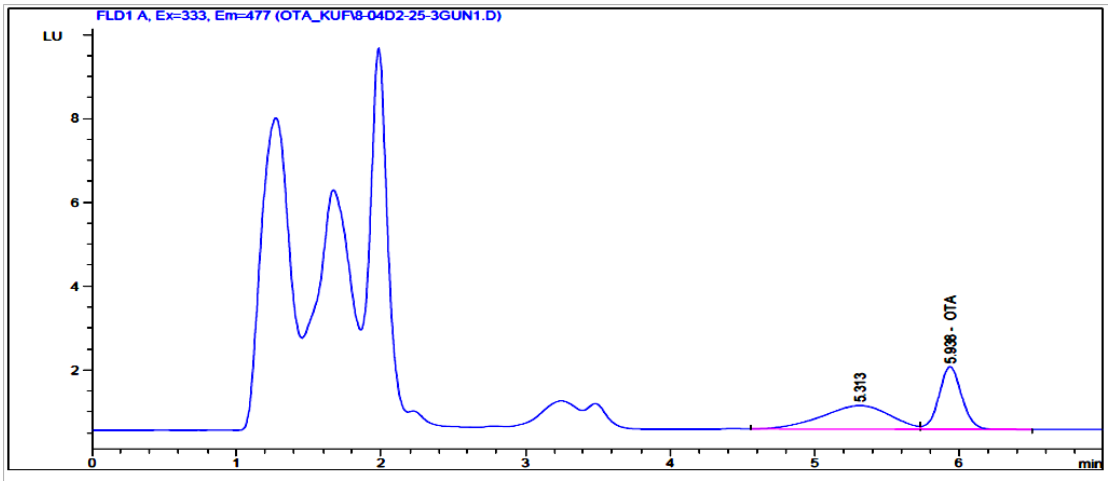
Çizelge B.11 : *A. carbonarius* 46D2 izolatının lag fazı süresine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Sıcaklık	3	69,273	23,091	6659,51	0,000
Hata	4	0,014	0,003		
Toplam	7	69,287			

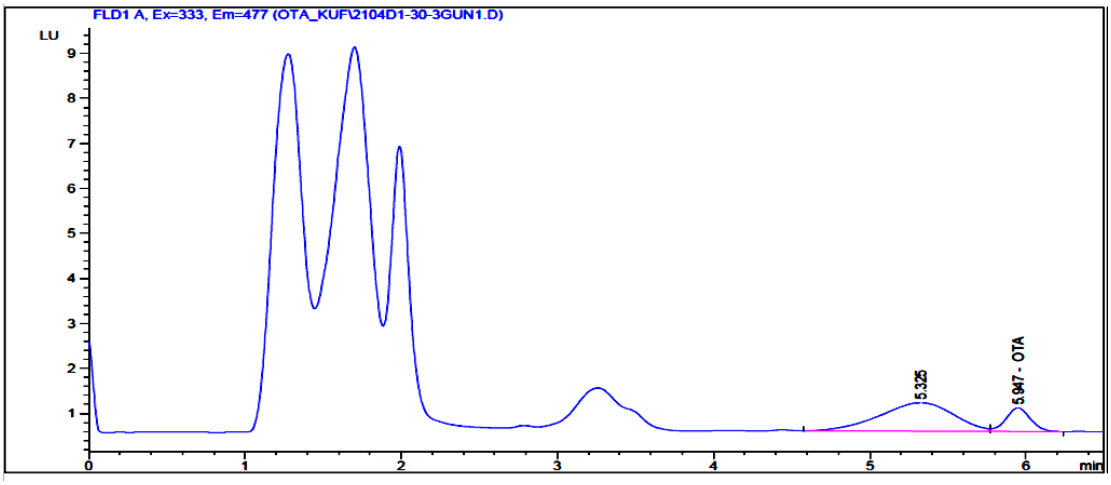
Çizelge B.12 : *A. niger* agg. 6Y1 izolatının lag fazı süresine sıcaklığın etkisi.

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Sıcaklık	5	31,0781	6,2156	2258,52	0,000
Hata	6	0,0165	0,0028		
Toplam	11	31,0946			

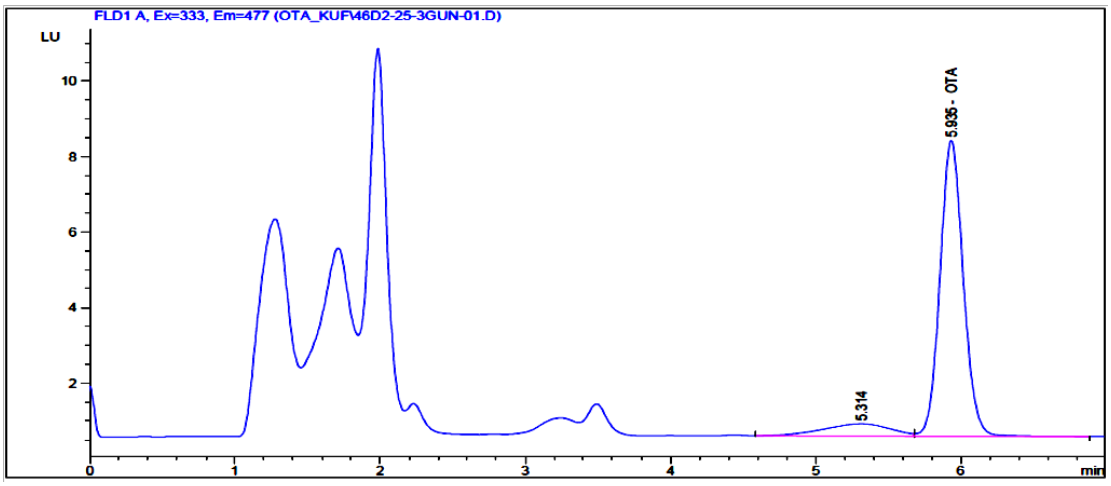
EK C: Yüksek Basınçlı Sıvı Kramatografisi Sonuç Kromatogramları Örnekleri.



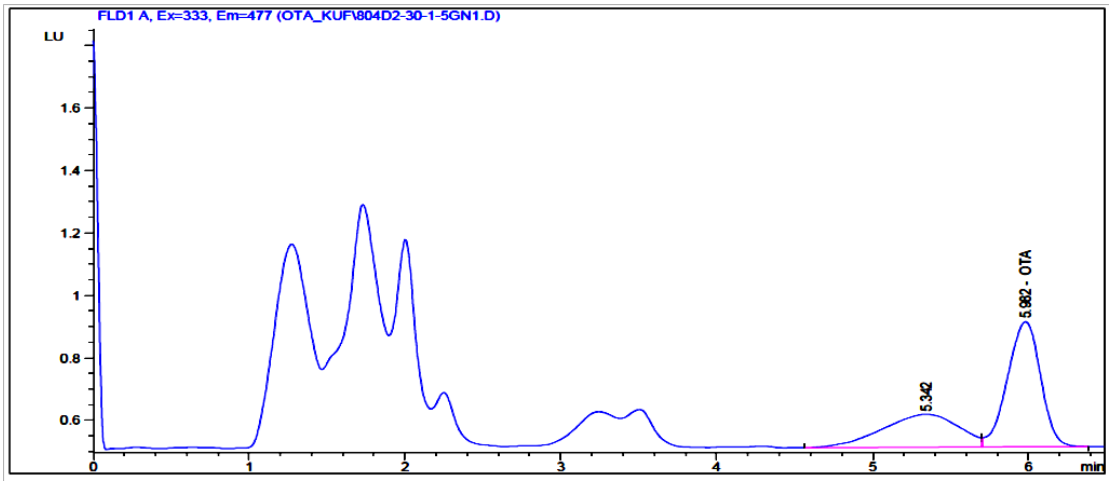
Şekil C.1 : 8-04D2 nolu izolatın 25 derecede 3.güne ait kromatogramı.



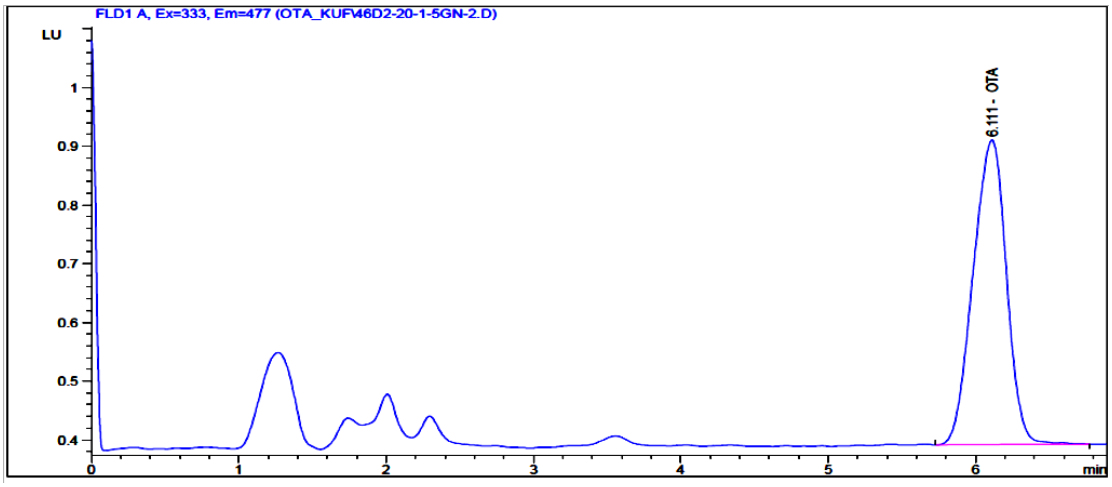
Şekil C.2 : 21-04D1 nolu izolatın 30 derecede 3.güne ait kromatogramı.



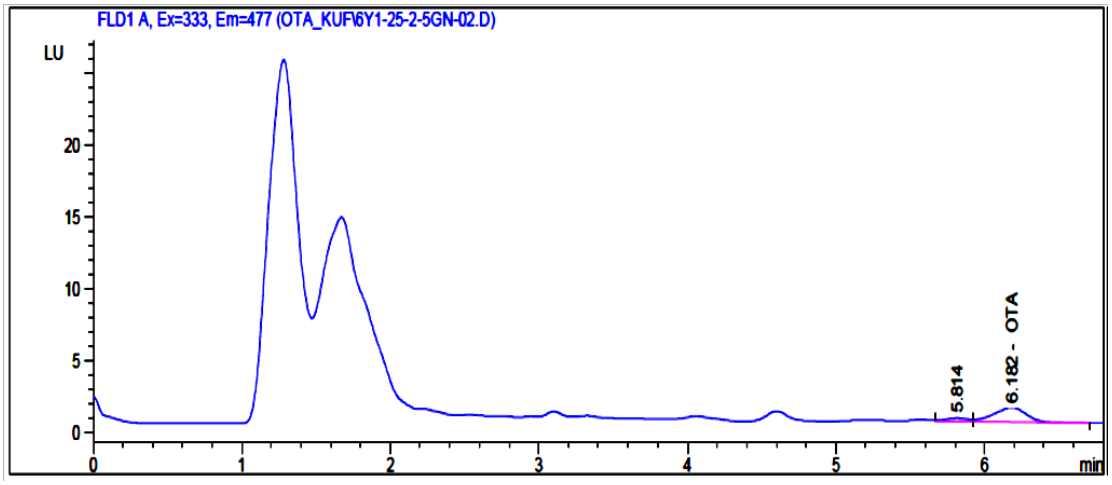
Şekil C.3 : 46D2 nolu izolatın 25 derecede 3.güne ait kromatogramı.



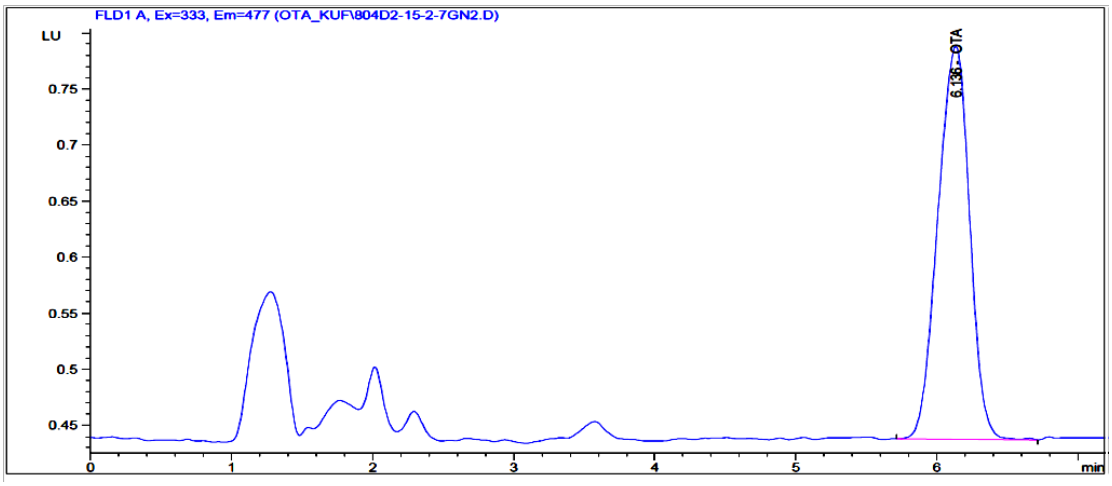
Şekil C.4 : 8-04D2 nolu izolatın 30 derecede 5.güne ait kromatogramı.



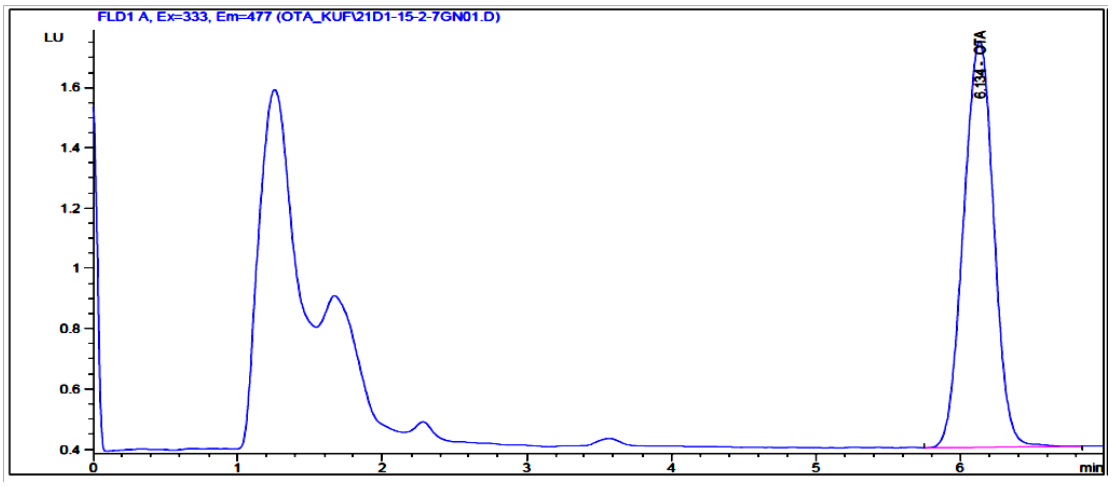
Şekil C.5 : 46D2 nolu izolatın 20 derecede 5.güne ait kromatogramı.



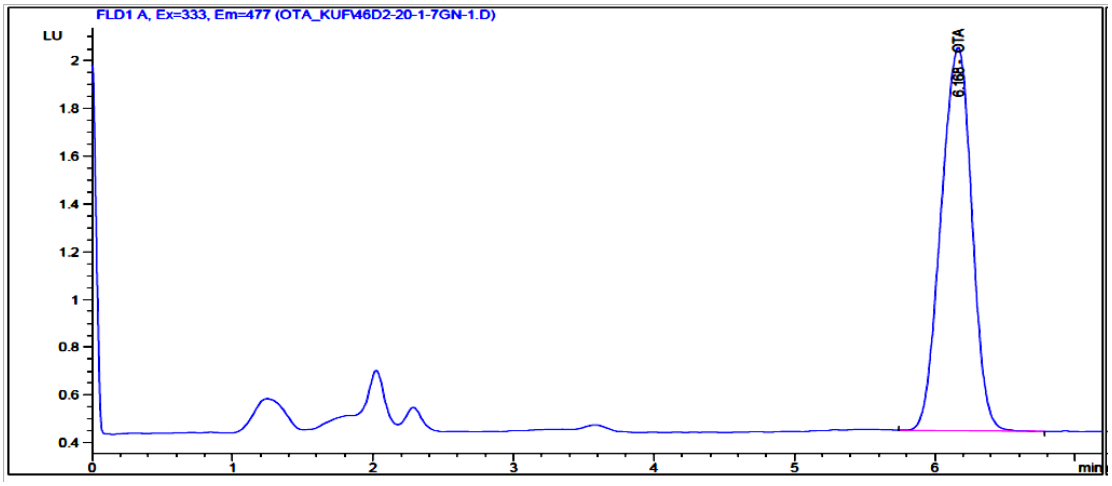
Şekil C.6: 6Y1 nolu izolatın 25 derecede 5.güne ait kromatogramı.



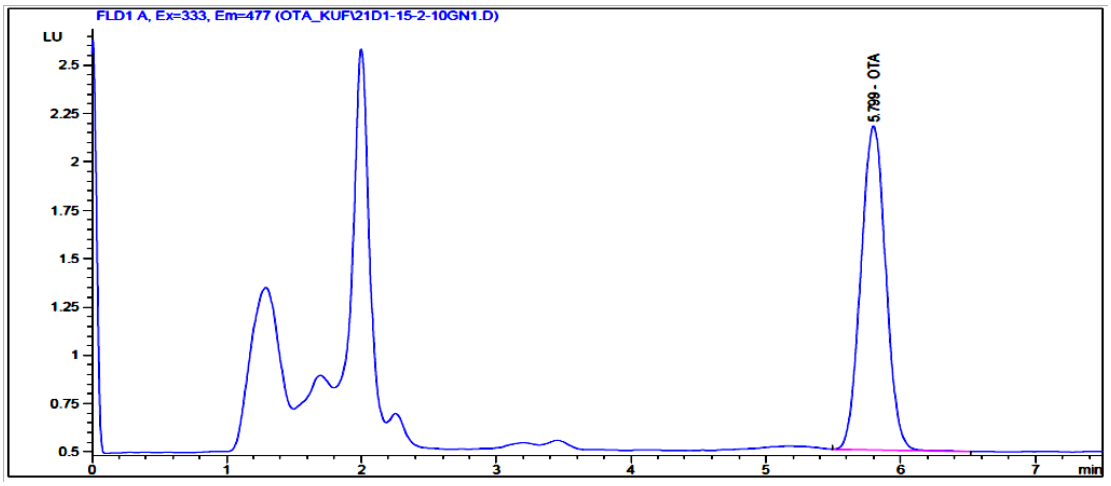
Şekil C.7 : 8-04D2 nolu izolatın 15 derecede 7.güne ait kromatogramı.



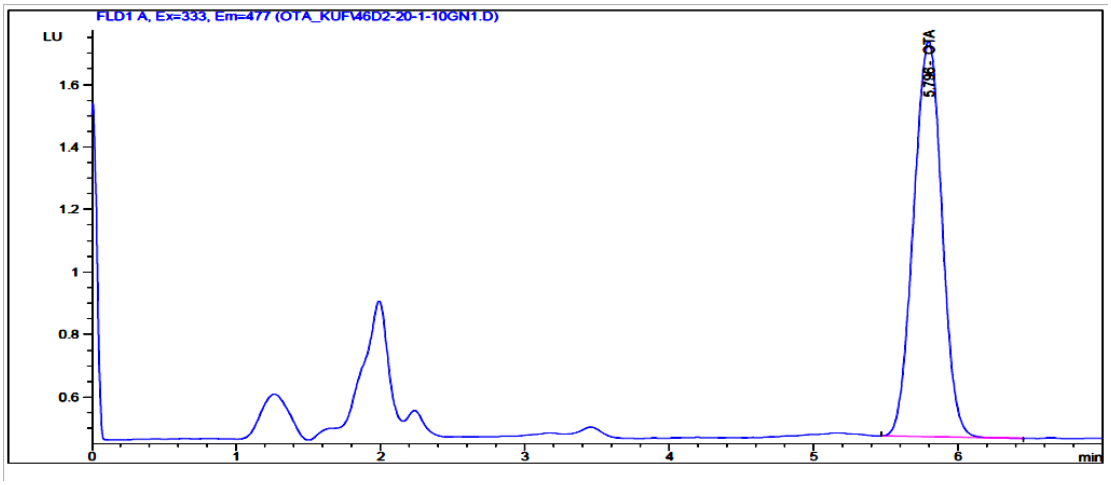
Şekil C.8 : 21-04D1 nolu izolatın 15 derecede 7.güne ait kromatogramı.



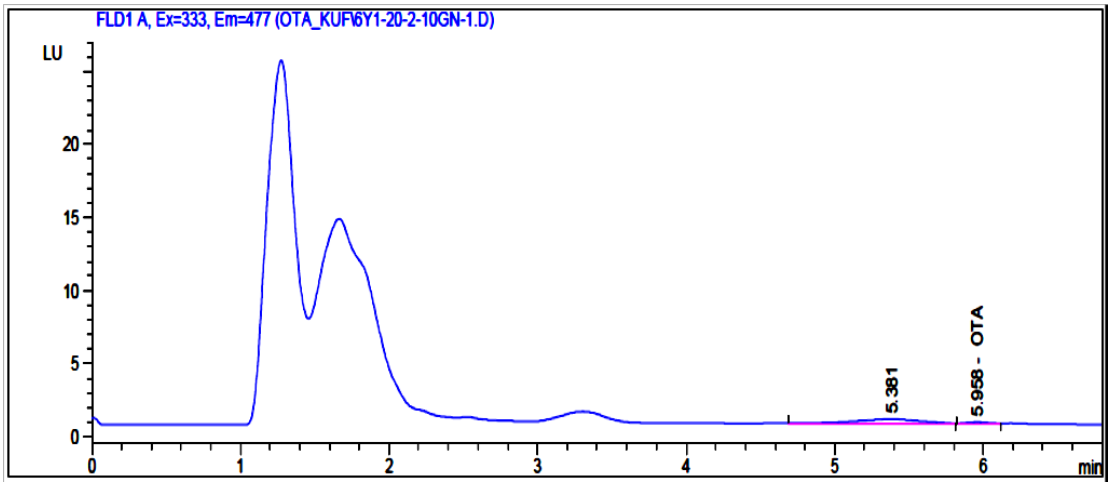
Şekil C.9 : 46D2 nolu izolatın 20 derecede 7.güne ait kromatogramı.



Şekil C.10 : 21-04D1 nolu izolatın 15 derecede 10.güne ait kromatogramı.



Şekil C.11 : 46D2 nolu izolatın 20 derecede 10.güne ait kromatogramı.



Şekil C.12 : 6Y1 nolu izolatın 20 derecede 10.güne ait kromatogramı.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Ayşegül MUTLU

Doğum Yeri ve Tarihi: Tosya/1988

Adres: Büyükdere Caddesi, Rumelihisarüstü Mah. No:15/1

Sarıyer/İSTANBUL

E-Posta: mutluays@itu.edu.tr - aysegul.mutlu88@gmail.com

Lisans: Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Mesleki Deneyim ve Ödüller:

Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Lisans Programı Bölüm 2.liği
Tübitak Yurtiçi Yüksek Lisans Bursu
Yörsan Gıda Mamülleri San. ve Tic. A.Ş., Stajyer öğrenci, 15/06/2009-14/07/2009
EGAM GRUP ISO 2200:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi, 2009