T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

FARKLI BESİYERİ ORTAMLARINDA ŞELAT AJANLARININ KULLANIMIYLA *Aspergillus flavus* GELİŞİMİ VE AFLATOKSİN ÜRETİMİNİN ÖNLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞULE GÜNAYDIN

DENİZLİ, NİSAN - 2018

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

FARKLI BESİYERİ ORTAMLARINDA ŞELAT AJANLARININ KULLANIMIYLA *Aspergillus flavus* GELİŞİMİ VE AFLATOKSİN ÜRETİMİNİN ÖNLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞULE GÜNAYDIN

DENİZLİ, NİSAN - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Şule GÜNAYDIN tarafından hazırlanan "Farklı Besiyeri Ortamlarında Şelat Ajanlarının Kullanımıyla *Aspergillus flavus* Gelişimi ve Aflatoksin Üretiminin Önlenmesi" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 30.04.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Danışman Doç. Dr. Hakan KARACA	.....
Üye Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK	.....
Üye Dr. Öğretim Üyesi Şeref TAĞI	.....

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23/05/2018 tarih ve ...21/10... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016 FEBE 007 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Şule GÜNAYDIN

Ş. Günaydın

ÖZET

FARKLI BESİYERİ ORTAMLARINDA ŞELAT AJANLARININ KULLANIMIYLA *Aspergillus flavus* GELİŞİMİ VE AFLATOKSİN ÜRETİMİNİN ÖNLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞULE GÜNAYDIN

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. HAKAN KARACA)

DENİZLİ, NİSAN - 2018

Bu çalışmada, aflatoksin üreticisi *Aspergillus flavus* (MAM-200682) küfünün gelişimi ve toksin üretmesi için ihtiyaç duyduğu mineral maddeler Czapek-dox agar (CZA) besiyeri temel alınarak, modifiye edilmiş besiyeri ortamlarında tespit edilmiştir. Bu tespitten sonra, farklı besiyerlerinde, sitrik asit, fitik asit ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) şelat ajanlarının küf gelişimini ve toksin oluşumunu önlemedeki etkinliği ortaya konmuştur. Ayrıca, CZA, Potato dextrose agar (PDA) ve kuru incirden hazırlanan besiyerinde küf gelişimi ve üretilen toksin miktarı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, sodyum nitrat içermeyen CZA besiyerinde inkübasyon süresi boyunca küf gelişimi gözlenmemiştir ($p<0.05$). Besiyeri bileşimden diğer bileşiklerin (magnezyum sülfat, demir (III) sülfat, potasyum klorür ve potasyum fosfat) çıkarılması durumunda küfün, kontrol grubu besiyeri ile aynı düzeyde gelişim gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0.05$). Ancak, besiyerinden magnezyum sülfat ve demir (III) sülfat bileşiklerinin çıkarılması aflatoksin üretimini artırmıştır. *A. flavus*'un en hızlı kuru incirden hazırlanan besiyerinde geliştiği, en fazla PDA besiyerinde aflatoksin ürettiği belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan tüm besiyerlerinde, EDTA'nın küf gelişimini inhibe etmede diğer şelat ajanlarından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. EDTA, küfün aflatoksin üretimini önlemede de etkili bulunmuştur. Bu ajanın 1.75 mM'lık konsantrasyonunun PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerinde aflatoksin üretimini %90'ın üzerinde azalttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Sitrik asit ve fitik asit küf gelişimini sadece PDA besiyerinde inhibe ederken, fitik asitin CZA ve PDA besiyerinde aflatoksin üretimini azaltmada kısmen etkili olduğu, sitrik asitin ise önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Kuru incirden hazırlanan besiyerinde tüm şelat ajanları aflatoksin üretimini %90'ın üzerinde azaltmıştır. Bu bulgular; şelat ajanı uygulamasının, kuru incirlerde sıkça yaşanan aflatoksin kontaminasyonu probleminin çözümünde umut verici sonuçlar ortaya koyabileceğinin göstergesidir.

ANAHTAR KELİMELER: Küf, aflatoksin, mineral maddeler, şelat ajanları, Czapek-dox agar, Potato dextrose agar, kuru incirden hazırlanan besiyeri

ABSTRACT

PREVENTION OF *Aspergillus flavus* GROWTH AND AFLATOXIN FORMATION IN DIFFERENT MEDIA BY USING CHELATING AGENTS

MSC THESIS

SULE GUNAYDIN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. HAKAN KARACA)

DENİZLİ, APRIL 2018

In this study, minerals required for the growth and toxin production of *Aspergillus flavus* were determined in modified media based on Czapek-dox agar (CZA). After this determination, the effectiveness of citric acid, phytic acid and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) chelating agents in preventing the mold growth and toxin formation was detected in different media. Additionally, the mold growth and amount of toxin produced were determined in CZA, Potato dextrose agar (PDA) and dried-fig extract agar. The present study revealed that mold growth was not observed in CZA without sodium nitrate during incubation period ($p<0.05$). The removal of other components (magnesium sulfate, iron (III) sulfate, potassium chloride, potassium phosphate) from the medium did not affect the growth of mold ($p>0.05$). However, the removal of magnesium sulfate and iron (III) sulfate compounds increased aflatoxin production. *A. flavus* grew faster on dried-fig extract agar and the amount of toxin produced was higher in PDA among all the media tested. In all media used in this study, EDTA was found to be more effective than the other chelating agents in preventing the growth of mold. EDTA was also effective in preventing the production of aflatoxin. It was determined that 1.75 mM EDTA reduced aflatoxin production over 90% in PDA and dried-fig extract agar ($p<0.05$). Citric acid and phytic acid inhibited the growth of mold only in PDA medium. Phytic acid was partially effective in reducing aflatoxin production in CZA and PDA media, whereas citric acid was found to have no significant effect ($p>0.05$). All chelating agents reduced aflatoxin production over 90% in dried-fig extract agar. These finding demonstrate that the application of chelating agents could give promising results for solving aflatoxin contamination problem.

KEYWORDS: *Aspergillus flavus*, aflatoxin, mineral materials, chelating agents, Czapek-dox agar, Potato dextrose agar, dried-fig extract agar

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **v**
TABLO LİSTESİ ..... **vi**
SEMBOL LİSTESİ ..... **vii**
ÖNSÖZ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Tezin Amacı 2
1.2 Literatür Özeti 2
1.2.1 Gıdalarda Küf Gelişimi ve Mikotoksin Oluşumu 2
1.2.1.1 Küfler 2
1.2.1.2 Mikotoksinler 5
1.2.1.3 Önemli Mikotoksinler 7
1.2.1.3.1 Aflatoksinler 7
1.2.1.4 İncirde Küf Gelişimi ve Aflatoksin Oluşumu 9
1.2.1.4.1 İncirde Küf Gelişimi ve Aflatoksin Oluşumunun Önlenmesi 13
1.2.2 Şelat Ajanları 14
1.2.2.1 Gıdalarda Yaygın Olarak Kullanılan Şelat Ajanları ve Kullanım Amaçları 18
1.2.2.1.1 Sitrik Asit 18
1.2.2.1.2 Fitik Asit 19
1.2.2.1.3 EDTA 20
2. YÖNTEM **24**
2.1 *A. flavus*'un Gelişme Koşulları ve Muhafazası 24
2.2 *A. flavus* Suşunun Teşhisi ve Doğrulanması 24
2.3 Mineral Maddelerin *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi 25
2.3.1 Analizlerde Kullanılan Besiyeri 25
2.3.2 Modifiye Besiyeri Ortamlarını Oluşturan Bileşenlerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması 25
2.3.3 Modifiye Besiyeri Ortamlarının Hazırlanması 26
2.3.4 Modifiye Besiyerlerinde pH Ölçümü 29
2.3.5 Modifiye Besiyeri Ortamlarında *A. flavus* Gelişiminin Takibi 29
2.3.6 *A. flavus* Gelişimi Üzerine Sodyum ve Nitratın Etkisinin İncelenmesi 29
2.4 Farklı Besiyerlerinde *A. flavus* Gelişiminin Takibi 32
2.4.1 Kuru İncirden Besiyeri Hazırlama 32
2.5 Farklı Besiyerlerine Katkılanan Şelat Ajanlarının *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi 33
2.5.1 Şelat Ajanlarının Besiyeri Ortamına Katkılanması 34
2.5.2 Şelat Ajanı Katkılı Besiyerlerinde pH Ölçümü 34
2.5.3 Şelat Ajanı Katkılı Besiyerlerinde *A. flavus* Gelişiminin Takibi 35
2.6 Besiyeri Örneklerinde Aflatoksin Analizleri 35

2.6.1 Aflatoksin Standart Çözeltisinin Hazırlanması 36
2.6.2 Ekstraksiyon ve Temizleme 38
2.6.3 HPLC Analizleri 39
2.6.4 Aflatoksin Analizlerinde Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırının Belirlenmesi 40
2.6.5 Aflatoksin Ekstraktlarında Geri Alma Denemeleri 41
2.7 İstatistik Analiz 41
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 42
3.1 *A. flavus* Suşunun Teşhisi 42
3.2 Mineral Maddelerin *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi 43
3.3 *A. flavus* Gelişimi Üzerine Sodyum ve Nitratın Etkisi 45
3.4 Farklı Besiyerlerinde *A. flavus* Gelişimi 47
3.5 Farklı Besiyerlerine Şelat Ajanı İlavesinin *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi 48
3.5.1 CZA Besiyerine İlave Edilen Şelat Ajanlarının *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi 48
3.5.1.1 Sitrik Asit 48
3.5.1.2 Fitik Asit 49
3.5.1.3 EDTA 50
3.5.2 PDA Besiyerine İlave Edilen Şelat Ajanlarının *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi 52
3.5.2.1 Sitrik Asit 52
3.5.2.2 Fitik Asit 53
3.5.2.3 EDTA 54
3.5.3 Kuru İncirden Hazırlanan Besiyerine İlave Edilen Şelat Ajanlarının *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi 56
3.5.3.1 Sitrik asit 56
3.5.3.2 Fitik Asit 57
3.5.3.3 EDTA 58
3.5.3.3.1 Na_2-EDTA 59
3.5.4 Şelat Ajanı Katkılanan Besiyerlerinin pH Ölçüm Sonuçları 64
3.6 Besiyeri Örneklerinde Aflatoksin Analizi Sonuçları 66
3.6.1 *A. flavus* İnoküle Edilmiş Farklı Besiyeri Ortamlarında Aflatoksin Miktarının Belirlenmesi 66
3.6.2 Farklı Besiyerlerinde *A. flavus* Küfünün Aflatoksin Üretimi 68
3.6.3 Farklı Besiyerlerine Şelat Ajanı İlavesinin Aflatoksin Oluşumu Üzerine Etkisinin İncelenmesi 69
4. SONUÇ VE ÖNERİLER 74
5. KAYNAKLAR 78
6. ÖZGEÇMİŞ 95

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: a) *A. flavus* küfünün mikroskobik görünümü, b) *P. simplicissimum* küfünün mikroskobik görünümü 3
Şekil 1.2: Aflatoksin B_1, B_2, G_1 ve G_2'nin kimyasal yapısı 8
Şekil 1.3: İncirin kurutulması 11
Şekil 1.4: Şelat ajanlarının kimyasal yapıları 16
Şekil 2.5: Kuru incirden hazırlanan besiyerinin iş akım şeması 33
Şekil 2.6: İçerisinde 2 ppb aflatoksin B_1, 0.58 ppb aflatoksin B_2, 1.98 ppb aflatoksin G_1 ve 0.54 ppb aflatoksin G_2 bulunduran aflatoksin standart çözeltisine ait kromatogram 36
Şekil 2.7: Kuru incirden hazırlanan besiyerine ait kromatogram 37
Şekil 2.8: Aflatoksin kalibrasyon eğrileri 38
Şekil 3.9: Farklı besiyerlerinde gelişimi gözlenen *A. flavus* küfünün koloni rengi 42
Şekil 3.10: PDA besiyeri üzerinde gelişen *A. flavus* kolonisinden hazırlanan preparatın ışık mikroskobundaki görüntüsü 42
Şekil 3.11: CZA besiyerinde EDTA'nın küf gelişimini inhibe etme yüzdesi 50
Şekil 3.12: PDA besiyerinde sitrik asitin küf gelişimini inhibe etme yüzdesi 52
Şekil 3.13: PDA besiyerinde fitik asitin küf gelişimini inhibe etme yüzdesi 53
Şekil 3.14: PDA besiyerinde EDTA'nın küf gelişimini inhibe etme yüzdesi 55
Şekil 3.15: Kuru incirden hazırlanan besiyerinde Na_2-EDTA'nın küf gelişimini inhibe etme yüzdesi 59
Şekil 3.16: Farklı besiyerlerine katkılanan şelat ajanlarının küf gelişimini inhibe etme yüzdesi 61
Şekil 3.17: Mineral maddelerin aflatoksin oluşumu üzerine etkisi 66
Şekil 3.18: Farklı besiyerlerinde geliştirilen *A. flavus*'un aflatoksin üretimi 68
Şekil 3.19: Farklı besiyerlerine katkılanan şelat ajanlarının aflatoksin oluşumu üzerine etkisi 70
Şekil 3.20: EDTA katkılanan CZA besiyerinde *A. flavus* gelişimi 71
Şekil 3.21: PDA besiyerine katkılanan EDTA'nın kontrol grubu besiyerine göre aflatoksin B_1'in miktarını azaltmadaki etkisi 72

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Mikotoksinlerin üretimini etkileyen faktörler 6
Tablo 1.2: Metal şelatlarının stabilite sabitleri..... 15
Tablo 1.3: Gıdalarda yaygın olarak kullanılan şelat ajanlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri 17
Tablo 2.4: CZA besiyerinin bileşimi..... 25
Tablo 2.5: Besiyerlerinin mineral madde içeriğinde yapılan modifikasyonlar. 26
Tablo 2.6: Mineral madde içeriği modifiye edilmiş besiyerlerinin hazırlanması 28
Tablo 2.7: Besiyeri bileşimindeki sodyum ve nitrat franksiyonunda yapılan modifikasyolar..... 30
Tablo 2.8: Besiyerindeki sodyum ve nitrat franksiyonu modifiye edilen besiyerlerinin hazırlanması 31
Tablo 2.9: PDA besiyerinin bileşimi..... 32
Tablo 2.10: Aflatoksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC cihazının özellikleri ve analizlerdeki kromotografi koşulları 40
Tablo 3.11: Modifiye besiyerlerinde pH ölçüm sonuçları 43
Tablo 3.12: Mineral maddelerin yokluğunun küf gelişimi üzerine etkisi..... 45
Tablo 3.13: Küf gelişimi üzerine sodyum ve nitratın etkisi..... 46
Tablo 3.14: Farklı besiyerlerinde küf koloni çapı ölçüm sonuçları 47
Tablo 3.15: CZA besiyerinde sitrik asitin küf gelişimi üzerine etkisi 48
Tablo 3.16: CZA besiyerinde fitik asitin küf gelişimi üzerine etkisi..... 49
Tablo 3.17: Kuru incirden hazırlanan besiyerinde sitrik asitin küf gelişimi üzerine etkisi 56
Tablo 3.18: Kuru incirden hazırlanan besiyerinde fitik asitin küf gelişimi üzerine etkisi 57
Tablo 3.19: Kuru incirden hazırlanan besiyerinde EDTA'nın küf gelişimi üzerine etkisi 58
Tablo 3.20: Kuru incirden hazırlanan besiyerinde Na_2-EDTA'nın küf gelişimi üzerine etkisi 62
Tablo 3.21: Kuru incirden hazırlanan besiyerine katkılanan şelat ajanlarının küf gelişimi üzerine etkisi..... 63
Tablo 3.22: PDA besiyerine katkılanan şelat ajanlarının küf gelişimi üzerine etkisi 63
Tablo 3.23: CZA besiyerine katkılanan şelat ajanlarının küf gelişimi üzerine etkisi 63
Tablo 3.24: Şelat ajanı katkılanan besiyerlerinin pH ölçüm sonuçları 65

SEMBOL LİSTESİ

kg	**:**	Kilogram
g	**:**	Gram
mg	**:**	Miligram
µg	**:**	Mikrogram
ppb	**:**	Mikrogram/litre
l	**:**	Litre
ml:	**:**	Mililitre
µl	**:**	Mikrolitre
mmol	**:**	Milimol
µmol	**:**	Mikromol
mM	**:**	Milimolar
mm	**:**	Milimetre
µm	**:**	Mikrometre
^{o}C	**:**	Santigrat derece

ÖNSÖZ

Çalışma konusunun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesinde kıymetli fikirleriyle bana yol gösteren, beni yönlendiren, kendimi geliştirmeme yardımcı olan ve kendisiyle hem lisans eğitimim hem de yüksek lisans eğitimim süresince çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam sayın Doç. Dr. Hakan KARACA'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmanın yürütülmesinde gerekli olanakları sağlayan Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na, değerli fikirlerini benimle paylaşan sayın hocalarıma, çalışmam sırasında bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca, tez çalışmamı destekleyen üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine katkılarından dolayı teşekkür ediyorum.

Bu çalışmanın yürütülmesinde çok değerli fikirleriyle bana yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON ve Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK'e teşekkürlerimi sunuyorum. Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Araş. Gör. Halil İbrahim KAYA'ya teşekkür ediyorum.

Çalışmanın ilerlemesi adına bana mesaisini harcayarak katkıda bulunan Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Denizli İl Kontrol Laboratuvarı Mikotoksin Laboratuvarı şefi sayın Emine Evrim ÖZTÜRK'e teşekkür ediyorum.

Son olarak hayatım boyunca benden maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen, her daim yanımda olan sevgili annem ve babam Servet GÜNAYDIN ve Şuayip GÜNAYDIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

1. GİRİŞ

İncir (*Ficus carica* L.) kalori değeri yüksek, vitamin ve mineralce zengin, son derece lezzetli bir üründür. Bu meyve, kısa süren üretim sezonu nedeniyle genellikle kurutularak tüketilir. Türkiye, gerek taze gerekse kuru incir üretiminde ve ihracatında dünyada açık ara birinci sıradadır (Anonim 2017). Bahçeden tüketiciye kadar geçen süreçte incirde karşılaşılan sorunların başında özellikle sağlık açısından tüketimde tehlike ve ihracatta problem oluşturan aflatoksin sorunu gelmektedir. Aflatoksinler, belirli bazı küf türleri tarafından üretilen, yüksek toksik özellikleri nedeniyle insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara, hatta ölümlere yol açabilen metabolitlerdir (Şen ve Nas 2010).

Kuru incirlerde aflatoksin sorunu 70'li yıllardan günümüze dek süregelen ve hala kesin bir çözüme kavuşturulamamış ciddi bir sorundur. Kuru incirlerde aflatoksin sorununun çözümü için en akılcı yol küf kontaminasyonu ve toksin oluşumunun önlenmesidir. Ancak, geçmişten günümüze kadar yapılan çalışmalar çoğunlukla mevcut aflatoksinlerin giderilmesi veya azaltılması yönündedir. Bu amaçla; birçok fiziksel (ısı, ışınlama uygulaması vb.), kimyasal (asit, ozon uygulaması vb.) ve biyolojik yöntem (bakteri, maya, küf vb. mikroorganizmalar ile toksinleri azaltma) denenmiştir. Söz konusu yöntemler aflatoksinleri parçalamada etkin bulunmalarına karşın; teknik ve ekonomik açıdan uygun olmamaları, gıda maddesinin besin değerinde önemli değişikliğe ve zararlı bileşiklerin oluşmasına yol açmaları ve üründe kalıntı bırakmaları gibi nedenlerden dolayı uygulamaya aktarılamamışlardır (Heperkan 2006, Zorlugenç 2009).

İncir meyvesi, yüksek şeker ve mineral madde içeriğiyle küf gelişimi ve toksin oluşumu için iyi bir substrattır. Herhangi bir gıda maddesinde aflatoksin sorunundan bahsetmek için öncelikle toksin üretici küfün gıdaya bulaşması ve o gıdada gelişim gösterebilmesi gerekmektedir. Küflerin varlığını sürdürebilmeleri üzerine enerji kaynağı, oksijen, su aktivitesi, sıcaklık, pH gibi birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir. Bu faktörlerden biri de yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için gerekli mineral maddelerin (sodyum, potasyum, magnezyum, demir vb.)

varlığıdır (Turhan 2010). Çalışmamızda; gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan şelat ajanlarının "küflerin besiyeri ortamında gelişmesi için ihtiyaç duyduğu mineral maddeleri bağlayarak" küf gelişimi ve aflatoksin oluşumunu önlemedeki etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların, kuru incirde aflatoksin sorununun çözümüne katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

1.1 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının birinci amacı, önemli bir aflatoksin üreticisi küf olan *Aspergillus flavus*'un gelişmesi ve toksin üretmesi için ihtiyaç duyduğu mineral madde/maddeleri tespit etmektir. İkinci amacı, Czapek-dox agar, Potato dextrose agar ve kuru incirden hazırlanan besiyerinde küf gelişimi ve toksin oluşumunu incelemektir. Üçüncü ve son amacı ise, söz konusu besiyerlerine katkılanan sitrik asit, fitik asit ve EDTA şelat ajanlarının küf gelişimi ve toksin oluşumu üzerine etkisini ortaya koymaktır.

1.2 Literatür Özeti

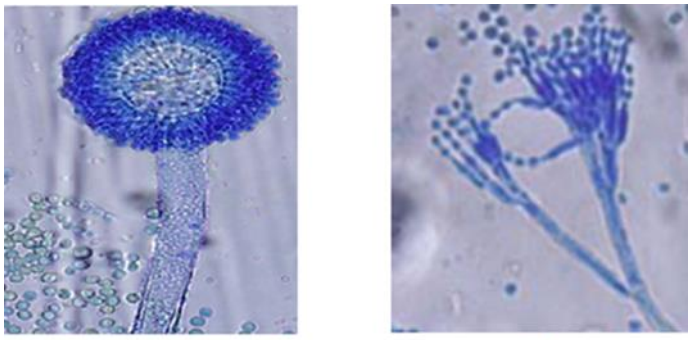
1.2.1 Gıdalarda Küf Gelişimi ve Mikotoksin Oluşumu

1.2.1.1 Küfler

Küfler çok hücreli ve flamentli (ipliksi hücrelerden oluşan) mikro-funguslar olarak tanımlanmıştır. Küf hücreleri art arda dizilerek hifleri, çeşitli şekillerde dallanma yapmak suretiyle bir araya gelerek miselyumu oluştururlar. Vejatatif hücre yapıları renksiz olan canlılardır. Ancak çoğalma elemanı olarak oluşturdukları sporlar gelişme ortamındaki koşullara, cins ve türe bağlı olarak değişen renklere sahiptirler (Özer 2009, Turhan 2010).

Küfler eşeyli ve eşeysiz olmak üzere iki tip çoğalma gösterirler. Eşeyli çoğalmada askospor veya zigospor olarak tanımlanan elemanlar oluşur ve bu sporlar

çimlendiğinde yeni nesiller meydana gelir. Küflerde asıl çoğalma şekli eşeysiz çoğalmadır. Eşeysiz çoğalmada sporlar bir kese içinde (endospor) ya da açıkta (ekzospor) oluşurlar. Ekzosporla çoğalmada diğer hiflerden daha kalın ve gelişme düzlemine daha dik bir taşıyıcı hif oluşur. Bu taşıyıcı hif konidi taşıyıcısı (konidiofor) olarak isimlendirilir. Konidi oluşumu ile çoğalmada bundan sonraki aşamalar farklılık gösterir. Bu çoğalmanın birinci şeklinde, konidiofor ucunda türe özgü ve büyüklükte vesikül denilen yapı oluşur. Küf türüne göre vesikülün dış yüzeyinde çıkıntılar meydana gelir. Vesiküle bağlı olan çıkıntılar metula, bunun uç kısmında oluşanlar ise fiyalid olarak adlandırılır. Daha sonra, fiyalidin ucunda konidi oluşumu meydana gelir. Konidilerden ilk oluşanlar dışa itilerek konidi zinciri oluşur ve tek bir çoğalma elemanında milyonlarla ifade edilebilecek sayıda spor oluşumu izlenir. Konidisporla çoğalmanın ikinci şeklinde ise, vesikül oluşmaz. Küf türünün kalıtsal özelliğine bağlı olarak konidiofor ucunda veya konidiofora dal ile bağlı metula ve/veya fiyalidler oluştuktan sonra konidi oluşumu izlenir. Konidiler türe özgü renk, şekil ve büyüklüktedir. Küf türüne göre değişkenlik gösteren tüm bu özellikler küflerin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır (Şahin ve Korukluoglu 2000). Şekil 1.1'de *A. flavus* ve *Penicillium simplicissimum* küflerinin mikroskobik görünümü verilmiştir (Sezek ve diğ. 2008).



Şekil 1.1: a) *A. flavus* küfünün mikroskobik görünümü, b) *P. simplicissimum* küfünün mikroskobik görünümü

Doğada hava, toprak, su ve organik maddeler üzerinde yaygın olarak bulunan küflerin gelişmelerini sınırlayan en önemli etken bulaştıkları yer ve ortamın su içeriğidir. Küfler, sentezledikleri enzimlerle aşırı karmaşık yapıdaki organik maddeleri en küçük birimine yıkarlar ve bunlardan besin kaynağı olarak yararlanırlar. Beslenmeleri için gerçekleştirdiği metabolik etkinlikler sırasında çok fazla sayı ve çeşitte madde oluşturmaktadırlar. Küflerin oluşturduğu birincil

metabolitler; alkoller, organik asitler, enzimler vb. iken, ikincil metabolitler ise antibiyotik ve mikotoksin gibi maddelerdir (Turhan 2010).

Küfler gelişip çoğalmaları için oksijen, su, karbon kaynağı, azot kaynağı, vitaminler ve minerallere ihtiyaç duyarlar. Gelişim istekleri en az olan mikroorganizma grubu küflerdir. Enerji ihtiyaçlarını karşılayabilmek, protein ve DNA gibi makromolekülleri oluşturmak için farklı besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Karbonhidratları sentezleyemezler. Proteince zengin ortamlarda karbonhidrat kaynağı olmadan karbon kaynağı olarak aminoasitleri kullanırlar (Turhan 2010). Küflerin gelişmelerini sürdürmeleri için ortamda bulunan sodyum (Na), potasyum (K) , magnezyum (Mg), demir (Fe) vb. mineral maddeler önemli rol oynamaktadır. Mineraller maddeler, metabolizmada; enzim aktivasyonu, taşınım prosesleri vb. önemli mekanizmalarda görev almaları nedeniyle her canlı organizma için elzemdirler (Abelson ve Aldous 1950). Literatürde, besiyeri ortamında gerçekleştirilen çalışmalarda, söz konusu mineral maddelerin belirli bir dozunun küf gelişimi ve toksin oluşumu için gerekli olduğu ortaya konmuştur (Davis ve diğ. 1967, Aziz ve Moussa, 1997). Ancak, yapılan bazı çalışmalarda ortamda belirli bir dozun üzerinde bulunan mineral maddelerin küf gelişimini önlediği tespit edilmiştir (Holmquist ve diğ. 1983, Shahin ve Aziz 1997, Stiles ve diğ. 2002).

Küflerin gelişmelerini sürdürebilmeleri üzerine sıcaklık, pH, su aktivitesi vb. faktörler de etkilidir. Küfler oda sıcaklığında, daha düşük sıcaklıklara nazaran daha hızlı gelişirler. pH 3-8 aralığında faaliyetlerini sürdürürler. Gelişim gösterdikleri su aktivitesi değeri 0.60-0.90 arasındadır. Yüksek şeker konsantrasyonuna sahip ortamlarda kolaylıkla gelişen, genellikle toprak ve hava kökenli kirliliklerin nedeni olan ve ortam koşullarına bağlı olarak toksik ikincil metabolitler üretebilen kserofilik özellikteki küfler 0.85 su aktivitesi değerinin altında gelişim gösterirler (Pitt ve Hocking 1997, Özyaral ve diğ. 2007, Özer 2009, Turhan 2010, Seçkin ve Taşeri 2015).

Tarımsal ürünlerin üretimden hasat, depolama ve tüketimine kadar geçen süreçte küflerin neden olduğu zararlar önem taşımaktadır. Küfler, gıdaların protein, yağ ve karbonhidratlarını enzimatik faaliyetlerle parçalayarak gıdanın dokusunu değiştirmekte, yağ içeriğinin azalmasına, serbest yağ asiti miktarının artmasına, proteinlerin parçalanmasına, aminoasit bileşiminde değişime, renk değişimine, kötü

koku oluşmasına, tat değişimlerine ve ağırlık kaybına neden olmaktadır. Ancak bütün bunların yanı sıra; en önemli zararları, ürettikleri mikotoksinlerle kontamine olmuş gıdalarla beslenen insanlar ve yemlerle beslenen hayvanlar üzerinedir (Özer 2009).

1.2.1.2 Mikotoksinler

Mikotoksinler; küf hücreleri tarafından sentezlenen ve üzerinde bulunduğu ürün ve gıda maddesinde salgılanabilen, küçük molekül yapısına sahip toksik özellikteki ikincil metabolitlerdir. Belirli bazı küf türleri tarafından çoğalma evresinin sonunda sentezlenmeye başlanırlar (Özer 2009).

Ürün üzerinde küfün gelişmesi, o küfün mutlaka toksin üreteceği anlamına gelmemektedir. Çünkü küflerin tümü mikotoksin üretmemektedir. Mikotoksinler, gıda ve yem maddesine bulaşmış mikotoksin üretme yeteneğine sahip küfler tarafından ancak uygun koşullar oluştuğunda üretilebilmektedir. Bununla birlikte ürün üzerinde küfe rastlanılmaması o üründe daha önceden mikotoksin oluşmadığı anlamına da gelmemektedir. Çünkü oluşan mikotoksin, ürün üzerinde küf inaktif olduktan veya uzaklaştırıldıktan sonra bile uzun süre kalabilmektedir (Özer 2009).

Mikotoksin üretme yeteneğine sahip olan küfler "toksijenik küfler" olarak adlandırılmaktadır. Yaygın olarak bulunan ve mikotoksinleriyle büyük problemler yaratan küfler arasında *Aspergillus, Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine ait toksik küfler sayılabilir. Mikotoksinleri üreten küf sporları rüzgar ve hava akımlarıyla taşınarak hemen her yerde (atmosferin çeşitli katmanları da dahil) bulunabilirler. Mikotoksin kontaminasyon düzeyi; iklim koşullarına, ürünün cinsine ve coğrafi konuma bağlı olarak mevsimden mevsime ve yıldan yıla farklılık gösterebilir (Karaca ve Yemiş 2008, Bakırcı 2014).

Mikotoksin üretimini etkileyen faktörlerden en önemlileri, küfün cinsi yani toksin üreten bir küf olup olmadığı, küfün ürüne bulaşma miktarı, ürünün olgunluk durumu, bileşimi, nem içeriği, ortam sıcaklığı ve depolama koşullarıdır. Mikotoksinlerin üretimini etkileyen faktörler Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1: Mikotoksinlerin üretimini etkileyen faktörler (Özer 2009).

Fiziksel Faktörler	Kimyasal Faktörler	Biyolojik Faktörler
Sıcaklık	Karbondioksit	Mikroorganizma yükü
Bağıl nem	Oksijen	Mikrobiyal flora
Kurutma hızı	Mineral içeriği	Böcek zararı
Mekanik zarar	Kimyasal işlemler	Hastalık zararı
	Substratın özelliği	Bitki çeşidi
		Bitki stresi

Mikotoksinler; yetişme sürecinde, hasat ve işleme sırasında, işlemeyi izleyen evrede ya da depolama evresinde gıdalarda toksijenik küfler tarafından üretilebilirler. Mikotoksikozis, mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yemlerin tüketilmesiyle ortaya çıkan hastalıklara verilen isimdir. Bu hastalıklar; karsinojenik (kanserojen), teratojenik (embriyonal hasarlar), tremorgenik (titreme ve refleks kayıpları sorunları), hemorojik (doku ve organlarda kanama sorunları), dermatitik (deride lezyonlar), hepatotoksik (karaciğer hasarları), nefrotoksik (böbrek sistemi hasarları), nörotoksik (sinir sistemi hasarları) vb. sağlık sorunları olarak sayılabilmektedir. Bu hastalıkların yanı sıra mikotoksikozis, ölüme sebep olabilen akut riskler de taşımaktadır (Bakırcı 2014).

Belirli bir küf türü birden fazla farklı mikotoksin oluşturabilmekte ve herhangi bir mikotoksin çeşidi farklı küf türleri tarafından üretilebilmektedir. Üretici suşları, oluşum şartları, kimyasal yapıları ve gösterdikleri toksik etkiler bakımından birbirinden ayrılan mikotoksinlere, küf gelişiminin gözlendiği yağlı tohumlar, mısır, arpa, baklagiller, bazı baharatlar, fındık, fıstık gibi kabuklu meyvelerle birlikte meyve ve sebzelerde ve bunlardan elde edilen birçok üründe rastlanabilmektedir. Günümüzde 300 civarında mikotoksinin varlığı tespit edilmiş olup, 350 kadar küf türünün bu mikotoksinleri oluşturduğu bilinmektedir. Karşılaşılma sıklıkları ve toksik etkileri göz önüne alındığında aflatoksinler, okratoksinler, patulin, fumonisinler, penisillik asit, sitrinin ve sterigmatosistin en önemli mikotoksinlerdir (Özer 2009, Nizamlıoğlu ve Çon 2010, Şen ve Nas 2010).

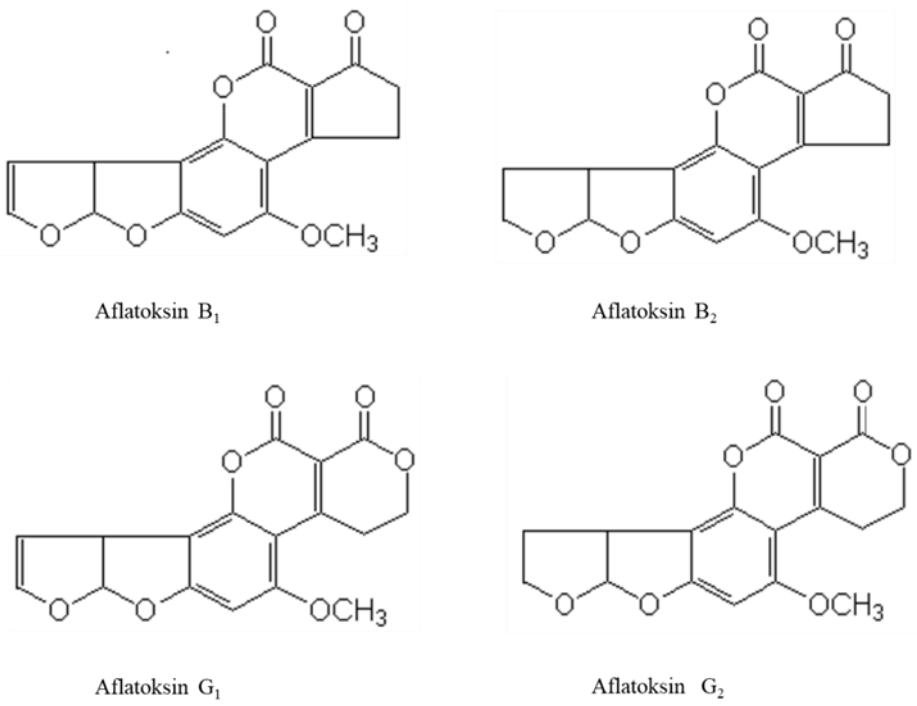
1.2.1.3 Önemli Mikotoksinler

1.2.1.3.1 Aflatoksinler

Önemli mikotoksinler arasında yer alan aflatoksinler, insan ve hayvan sağlığı açısından en tehlikeli olan toksinlerdir. İngiltere'de çok sayıda kanatlı hayvanın ölümü ile sonuçlanan "Turkey X" hastalığı sonucunda keşfedilmişlerdir. Yüz binden fazla hindi ve diğer çiftlik hayvanının ölümüyle sonuçlanan hindi hastalığı salgınları sonrasında aflatoksinler heterosiklik bileşikler ile bağlantılı bir grup olarak 1960 yılında bulunmuştur. Ülkemiz açısından ilk aflatoksin sorunu 1967 yılında Kanada'ya gönderilen 10 ton iç fındığın, 1971 yılında da ABD'ye ihraç edilen 45 parti antepfıstığının 31 partisinin aflatoksin içerdiği gerekçesiyle geri çevrilmesi sonucu ortaya çıkmıştır (Özpala 2006, Yentür ve Er 2012).

Aflatoksinler *A. flavus, A. parasiticus* ve *A. nomius* gibi bazı *Aspergillus* türleri tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Genellikle mısırda, fıstıkta, pamuk tohumunda, fındıkta, bademde, incirde, baharatlarda, süt ve süt ürünlerinde ve diğer gıda ve yem çeşitlerinde gözlenir. Süt, yumurta ve et ürünlerinin de bazen aflatoksin ile kontamine olmaları hayvanların aflatoksin içeren yemlerle beslenmesi sonucu olmaktadır. Aflatoksinler, kimyasal yapı olarak bifuran halkası ve lakton bağlantısı taşıyan yüksek yapılı kumarin bileşikleridir. Kloroform, metanol, ve diğer birçok çözücüde çözünebilmektedirler. Suda çözünürlükleri ise azdır ve 10-30 µg/ml arasında değişmektedir. Doğada yaygın olarak B_1, B_2, G_1, G_2 olmak üzere dört aflatoksin türü bulunmaktadır. Bu aflatoksin türlerininin kimyasal yapısı Şekil 1.2'de verilmiştir. Grubun diğer üyeleri ise aflatoksin türevleri olarak adlandırılmaktadır. Ortamda çoğunlukla en yüksek konsantrasyonda aflatoksin B_1 bulunur. Bunu sırasıyla G_1, B_2 ve G_2 izler. Bilinen aflatoksinlerin en toksik olanı aflatoksin B_1'dir. Aflatoksinler, 365 nm dalga boylu Ultraviyole (UV) ışığını kuvvetle absorblarlar ve aflatoksin B_1 ve B_2 için 425 nm'de; aflatoksin G_1 ve G_2 için ise 450 nm'de floresans emisyonu oluştururlar. Aflatoksinlerin birbirinden ayırt edilmelerinde floresans renkleri ve relatif kromatografik mobilitelerinden yararlanılmaktadır. UV lamba altında mavi renk floresans veren aflatoksinler "B", yeşil renk floresans verenler ise "G" olarak adlandırılmıştır. Buna ek olarak, sadece süt ürünlerinde bulunabilen ve

M_1 ve M_2 olarak adlandırılan aflatoksin türevleri de bulunmaktadır. Bu aflatoksinler ilk kez aflatoksinli yemlerle beslenen hayvanların sütlerinden izole edilmiş ve bundan dolayı "M" olarak isimlendirilmişlerdir (İşman 2004, Karaca 2005, Özer 2009).



Şekil 1.2: Aflatoksin B_1, B_2, G_1 ve G_2'nin kimyasal yapısı

Yapılan çalışmalar aflatoksinlerin genellikle *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin bazı suşları tarafından üretildiğini göstermektedir. *A. flavus*'un birçok suşu aflatoksin meydana getirmediği halde, doğada yaygın olarak bulunması ve karbonhidratça zengin substratlar üzerinde çok geniş sıcaklık aralıklarında gelişebilmesi aflatoksin oluşumunu teşvik etmektedir. Başlıca aflatoksin üreticisi olan *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un aflatoksin üretme yetenekleri farklılık göstermektedir. *A. parasiticus* hem aflatoksin B hem de aflatoksin G üretebilmektedir. Ayrıca bu küfün izolatları *A. flavus*'tan daha yüksek konsantrasyonlarda aflatoksin üretme yeteneğine sahiptirler. *A. flavus* ise suşa göre farklılık göstermekle birlikte B grubu aflatoksinleri yüksek düzeyde üretirken G grubu aflatoksinleri üretmemek de ya da düşük miktarda üretmektedir (Shotwell ve diğ. 1966, Koehler ve diğ. 1975, Gourama ve Bullerman 1995).

Aflatoksinler hasat, kurutma, depolama, gıda ve yem halinde ürünü işleme aşamasında oluşabildiği gibi ürün tarlada veya bahçede gelişirken de meydana gelebilmektedir. Aflatoksin oluşumunu; ürün nemi, kurutma hızı, ortamın nisbi nemi, sıcaklık, ortamda bulunan küf veya sporlarının yoğunluğu, gelişen türlerin toksin oluşturma güçleri, mikroorganizmalar arası rekabet, ürünün ve yetiştirilen çeşidin direnci, böcek veya diğer zararlıların faaliyeti, bitki stresi, hava sıcaklığı, atmosferik gazların bileşimi gibi birçok faktör etkilemektedir (Yentür ve Er 2012).

Aflatoksinlerin oluşumunda nisbi nem ve sıcaklık en önemli parametrelerdir. Toksin üreten küflerin gelişmesi için optimum şartlar 24–35°C sıcaklık aralığı ve %70'in üzerinde nisbi nemdir. Küflerin gelişmesi ve toksin üretmesi için gereksinim duyduğu ihtiyaçlar farklılık göstermektedir. Örneğin; küf gelişimi için gerekli olan sıcaklık ve su aktivitesi değerleri toksin oluşumu için gereksinim duyulan değerler ile aynı değildir ve türe göre de farklılık göstermektedir. *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un gelişmesi için su aktivitesi değeri sırasıyla 0.78 ve 0.82 iken toksin üretmesi için bu değer 0.82-0.83'dür. Benzer şekilde küf gelişimi ve toksin oluşumu için gerekli minimum sıcaklık değerleri de farklılık göstermektedir. *A. parasiticus* en düşük 6–8°C sıcaklık aralığında gelişirken optimum 25–35°C'de gelişmektedir. *A. flavus* ise en iyi 19–35°C sıcaklık aralığında gelişirken 12–42°C arasında toksin üretmektedir (Yıkılmaz 2007, Yentür ve Er 2012).

Aflatoksinlerin toksisiteleri üzerine yapılan çalışmalarda, bu mikotoksinlerin kuvvetli kanserojenik maddeler olduğu belirlenmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan denemelerde özellikle aflatoksin B_1'in karaciğer kanserine yol açtığı saptanmıştır. Epidemiyolojik çalışmalarda aflatoksin içeren gıdalarla beslenen insanlarda primer karaciğer kanserlerine ve karaciğer sirozlarına daha yüksek oranda rastlandığı ifade edilmiştir. Aflatoksin B_1'in kanserojen etkisinin yanı sıra mutajen, teratojen ve immunosupresif etkilere sahip olduğu gözlenmiştir (Gümüş ve Yılmaz 2006).

1.2.1.4 İncirde Küf Gelişimi ve Aflatoksin Oluşumu

İncir meyvesi, Anadolu'da insanlık tarihi kadar eski dönemlere dayanan kültür meyveleri içinde, en eski gelişme tarihine sahip meyvelerden biridir. Akdeniz kıyılarının tipik bir meyvesi olan incir subtropikal iklim kuşağındaki ülkelerde

yetişmektedir. Bu iklim kuşağı içerisinde yer alan Ege Bölgesi'nin Büyük Menderes ve Küçük Menderes Havzaları, incir yetiştiriciliği açısından en ideal ekolojik koşullara sahip yörelerdir. İşte bu nedenle, incir Ege Bölgesi ve ülkemiz ekonomisi için en önemli tarımsal gelir kaynaklarından biridir (Karaca 2005).

Yıllara göre değişmekle birlikte yaklaşık 105.000 ton civarında olan dünya kuru incir üretiminin yarısına yakın bir bölümü ülkemiz tarafından gerçekleştirilmektedir. Son 7 yıllık veriler incelendiğinde; 2013-2014 yılında ülkemiz 106.955 ton olan dünya kuru incir üretimi içerisinde %58'lik payla birinci sırada yer almaktadır. Benzer durum kuru incir ihracatı içinde söz konusudur. Türkiye son 12 yılda yıllık ortalama 37 bin ton dolaylarında sofralık kuru incir ihracatı gerçekleştirmiştir. Yemeklik kuru incir ihracatının en yüksek olduğu sezon 55.6 bin ton ile 2014-15 sezonudur (Anonim 2017).

İncir meyvesi yüksek kalsiyum (Ca), fosfor (P) ve şeker içeriği ile besleyici bir meyvedir. Kısa süren üretim sezonu ve hassas yapısı nedeniyle genellikle kurutularak tüketilir. Ülkemizde incir sezonu Temmuz ayının ortalarında başlayıp Ekim ayı sonlarına kadar sürer. Kurutmalık olarak yetiştirilen incirler arasında az çekirdekli ve ince kabuklu "Sarılop" çeşidi başta olmak üzere "Göklop", "Karayaprak", "Hesevi" ve "Halebi" çeşitleri de yer almaktadır (Karaca 2005). Diğer meyvelerden farklı olarak incirler, ağaçta bırakılarak kurumaya terk edilmektedir. Olgunlaşmasına rağmen ağaçta bırakılan meyve zamanla buruklaşır, tutunamayacak derecede olunca kuruyup yere düşer. Yerden toplanan incirler kerevetlere serilerek gölge bir yerde 8-10 gün içinde %20-25 nem içeriğine ulaşana kadar sergilerde kurutulurlar. Söz konusu işlemler ile ilgili görseller Şekil 1.3'te verilmiştir. Yeterli nem içeriğine kadar kurutulan incirler üreticiler tarafından plastik kasalara doldurulur ve incir işletmelerine getirilir. İncir işletmesinde bazı işlemler (eleme, sınıflandırma, yıkama vb.) uygulandıktan sonra piyasaya sunulur (Yıkılmaz 2007).

Şekil 1.3: İncirin kurutulması

İncirde aflatoksin oluşumunda su aktivitesi, sıcaklık, nem, ürün bileşimi gibi faktörler önemlidir. Meyvenin su aktivitesi değerine bağlı olarak aflatoksin üreticisi küflerden *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un aflatoksin üretmeye eğilimli olduğu bilinmektedir. Yeni olgunlaşmış meyve 0.91-0.97 su aktivitesi değeri ile küf kontaminasyonu için, ağaçta kurumaya başlayan meyve ise 0.80- 0.89 su aktivitesi değeri ile mikotoksin oluşumu için uygun bir substrattır. Olgunlaşma, hasat ve kurutma dönemi boyunca üretim bölgelerinde ortalama sıcaklık 27-30°C'dir. Bu sıcaklık derecesi, küf ve toksin oluşumu için gerekli olan optimum sıcaklık derecesine çok yakındır. Toksin oluşumu, küf gelişimine bağlı olduğu gibi, substratın kimyasal bileşimiyle de yakından ilişkilidir. İncir meyvesi yüksek şeker ve mineral madde içeriği nedeniyle aflatoksin oluşumu için iyi bir substrattır (Yıkılmaz 2007).

Olgunlaşmamış yeşil renkli incirde küf istilasına karşı belirli bir direnç söz konusudur. Bu dönemdeki meyve, aflatoksin üreticisi küfle kontamine olsa bile meyvenin yapısının toksin üretimine uygun olmaması nedeniyle aflatoksin oluşumu gözlenmemektedir. Meyve olgunlaştıkça bu direnç kaybolur ve küf bulaşması bakımından en kritik basamak olan sert olgun basamağa (taze incir haline) gelir. En yüksek aflatoksin seviyesine ise küfün en uzun kolonizasyon periyoduna sahip olduğu kahverengi-buruşuk meyvelerde rastlanmıştır (Demir ve diğ. 1990, Boudra ve diğ. 1994). İncirin, en hassas dönemi olan sert olgun dönemi küfle kontamine olmadan atlatabilmesi durumunda, sonraki aşamalarda kuruyup çürümeye karşı daha dayanıklı hale geleceği bildirilmiştir. Aksi halde aflatoksin birikiminin fungal

gelişimin durduğu ana kadar kuruma boyunca süreceği vurgulanmıştır (Buchanan ve diğ. 1975, Doster ve Michailides 1997).

Kuru incirde aflatoksin sorunu hem sağlık açısından hem de ihracatta yarattığı ekonomik kayıplar nedeniyle önemlidir. Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde kurutulmuş meyvelerde aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin için limitleri iki ayrı kategoride ele alınmıştır. Birinci kategoride, insanlar tarafından doğrudan tüketilmeden önce ya da herhangi bir ürünün bileşimine ilave edilmeden önce bazı fiziksel uygulamalardan (sınıflandırma vb.) geçirilecek kuru meyveler için aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin limitleri sırasıyla 5 ve 10 ppb olarak tespit edilmiştir. İkinci kategoride ise, insanlar tarafından doğrudan tüketilecek ya da herhangi bir ürünün bileşimine doğrudan ilave edilecek kuru meyveler için aynı limitler sırasıyla 2 ve 4 ppb olarak belirlenmiştir (Anonim 2010). Buna karşın "Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ"e göre kurutulmuş meyvelerde aflatoksin B_1'in sınır değeri 8 ppb iken toplam aflatoksin miktarının sınır değeri 10 ppb olarak belirtilmiştir (Anonim 2011).

Kuru incirlerde aflatoksin sorunu ilk kez 1972 yılında Danimarka'ya ihraç edilen incirlerde yüksek miktarda (938 ppb) aflatoksin saptanması ile ortaya çıkmıştır. Ancak, ilgili ülke tarafından söz konusu incirlerin Noel nedeniyle tüketilmiş olmalarından dolayı iade edilmedikleri ve Türkiye'den ihraç edilecek incirlerde aflatoksin kontrolünün yapılması gerektiği belirtilmiştir (Özpala 2006).

1973-74 yıllarında ABD'ye gönderilen kuru incirlerde, Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından yapılan taramada 38 partinin 3 partisinde aflatoksin saptanmış ve bu partiler geri gönderilmiştir. 1986 yılında ise İsviçre'ye gönderilen 1985 yılı kuru incirlerinde, söz konusu ülke tarafından tolerans sınırlarının üzerinde aflatoksin belirlendiğinin bildirilmesi ile konu yeniden güncellik kazanmıştır (Özpala 2006). Bu tarihten beri kuru incirde aflatoksin problemi ihracatımız için büyük tehlike oluşturmaktadır.

AB ülkeleri oluşturdukları Gıda ve Yemlerde Hızlı Alarm Sistemiyle (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) birliğe giren tüm yem ve gıda maddelerini mikotoksin, pestisit, ağır metal bulaşıları vb. yönünden incelemekte ve elde ettikleri bulguları, birliğin diğer ülkeleriyle paylaşmaktadır. Sistemde, AB ülkelerine

Türkiye'den ihraç edilen kuru meyvelerin (incir, üzüm vb.) incelenmesi sonucunda, mikotoksin kontaminasyonuyla ilgili son 5 yılda toplam 356 adet uygunsuzluk bildirimi yayınlanmıştır. Bu sayıda en büyük pay, 300 adet bildirimle kuru incirlerde aflatoksin kontaminasyonuna aittir (RASFF 2012, RASFF 2013, RASFF 2014, RASFF 2015, RASFF 2016).

1.2.1.4.1 İncirde Küf Gelişimi ve Aflatoksin Oluşumunun Önlenmesi

Birçok gıda maddesi ve hayvan yeminde olduğu gibi incir meyvesinde de küf gelişimi ve aflatoksin oluşumunun önlenmesine yönelik alınacak tedbirler aflatoksin sorununun çözümü için en akılcı yol olarak görülmektedir. Bu amaçla incir henüz daha bahçedeyken temiz ilek kullanılması, hasat zamanında yere düşen incirlerin uzun süre yerde bırakılmaması, kurutmanın kerevetlerde yapılması ve tam kuruma sağlanması gibi bazı hususlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu hususlara dikkat edilmesi durumunda dahi aflatoksin sorununun çözümünde kesin başarı sağlanamamaktadır. Bu nedenle, incirde daha çok aflatoksinlerin giderilmesi veya azaltılması yönünde çalışmalar yapılmaktadır (Karaca 2005, Yıkılmaz 2007).

Aflatoksinlerin degradasyonu için yani bir gıdada aflatoksinlerin giderilmesi veya azaltılması için birçok yöntem denenmiştir. Söz konusu yöntemleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç gruba ayırmak mümkündür. Fiziksel yöntemler arasında yüksek ısı uygulamaları (150°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda), ışınlama, adsorbsiyon, solventlerle özütleme vb. çeşitli yöntemler yer almaktadır. Kimyasal yöntemlerde aflatoksinlerin asit, bisülfit, hipoklorit, amonyak, ozon gibi kimyasallarla muamelesi söz konusudur. Biyolojik yöntemlerle aflatoksinlerin degradasyonu ise ortamda bulunan bakteri, maya ve küf vb. mikroorganizmaların varlığıyla çoğunlukla enzimatik degradasyon ve sorpsiyon yolu ile gerçekleşmektedir (Özkaya ve Temiz 2003, Kabak ve Var 2005, Zorlugenç 2009).

Bugün ülkemizde incir işletmelerinde uygulanan ve fiziksel bir ayırma olarak nitelendirebileceğimiz pratik bir yöntem ile kuru incirde aflatoksin sorununun önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Bu yöntem kuru incirlerin 365 nm dalga boylu UV ışık altında incelenmesiyle ortaya çıkan ve aflatoksin varlığıyla arasında çok kuvvetli bir ilişki olduğu saptanmış parlak yeşilimsi sarı floresans (bright greenish yellow

fluorescence =BGYF) veren incirlerin ayıklanmasıdır. Ancak floresans veren tüm incirlerin ayıklanması halinde bile yığında halen aflatoksin içeren incirler bulunabilmektedir. BGYF veren bu bileşiğin bitkilerdeki peroksidaz enziminin, fungal bir metabolit olan kojik asit ile reaksiyonu sonucu ortaya çıktığı öne sürülmüştür (Zeringue ve diğ. 1999). Bazı incirlerin aflatoksin ile kontamine olmalarına rağmen BGYF vermemelerinin nedenleri arasında incirlerin güneş ışığına maruz kalması sonucu floresans veren bileşiğin yapısının bozulması veya bu bileşiğin yağan yağmur ile yıkanıp gitmesi sayılabilir. Ayrıca, bazı incirlerin iç kısmında yoğun floresans görülmesine karşın dış kısmında floresans yoğunluğunun azalabildiği bildirilmiştir. Tüm bunlar aflatoksin ile kontamine olmuş bazı incirlerin BGYF vermemelerinin nedeni olarak gösterilmektedir. İşte bu nedenlerle UV lamba altında fiziksel yolla ayırmaya alternatif olarak, fiziksel kimyasal ve biyolojik yöntemler veya bunların kombine uygulamaları ile incirlerdeki aflatoksinler giderilmeye çalışılmaktadır (Karaca 2005). Aflatoksinlerin giderilmesi işleminin en büyük dezavantajı ise, toksinlerin parçalanması sonucu ortamda oluşabilecek yeni bileşiklerin tanımlanamaması ve toksisitesinin bilinmemesidir. Bu nedenle, incirde küf gelişimi ve aflatoksin sorununun çözümünde en akıllıca yolun, meyve üzerinde küf gelişimini önleyerek aflatoksin oluşumunu engellemek olduğu açıktır.

1.2.2 Şelat Ajanları

Şelat ajanları, ortamda serbest halde bulunan mineral maddeler ile stabil yapıda ve genellikle suda çözünebilen kompleksler meydana getirerek, bunların gıdalarda neden olduğu istenmeyen reaksiyonları (acılaşma, renk değişimi vb.) engelleyen maddelerdir. Şelat ajanlarının tek başlarına antioksidatif etkileri bulunmamakla birlikte gıdaların tadını, rengini ve besin değerini korumalarında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission, CAC) tarafından şelat ajanları "antioksidanların ve emülsifiye edici tuzların alt sınıfı" olarak ifade edilmesine karşın AB direktiflerinde ayrı bir sınıf olarak ele alınmaktadır (Gür ve Demirağ 2009).

Paylaşılmamış elektron çiftleri olan her molekül ve iyon, metal iyonları ile kompleks meydana getirebilmektedir. –OH, -SH, -COOH, $-PO_3H_2$, C=O, $-NR_2$, -S ve

-O- gibi birbirine uygun geometrik yapıda iki veya daha fazla fonksiyonel grup içeren bileşikler uygun ortamlarda metaller ile şelat oluşturabilmektedirler. Bir maddenin şelat ajanı özelliği gösterebilmesi için, ajanın 5'li veya 6'lı halka meydana getirebilmesi gerekmektedir. Şelat ajanlarının yapısal özelliklerinin yanı sıra pH gibi bazı kimyasal özellikleri de kuvvetli metal şelatlarının oluşumunu etkilemektedir. Örneğin; iyonize halde olmayan bir karboksilik grup etkin olmamasına karşın, karboksilat iyonunun şelatlama fonksiyonu oldukça etkilidir. pH'da meydana gelen artışlar karboksil grubunun iyonlaşmasına olanak vermekte ve şelat oluşturma verimini artırmaktadır (Gür ve Demirağ 2009).

Şelatlama reaksiyonu bir denge reaksiyonudur. Şelat ajanı ile metal arasındaki reaksiyonda şelatlanmış metal iyonlarının şelatlanmamış olanlara oranı "stabilite sabiti" olarak adlandırılır ve ajanın şelatlama gücünün bir göstergesidir. Stabilite sabitinin artması ile şelat ajanının metal iyonlarını şelatlama eğilimi artmakta ve katyon formunda daha az metal kalmaktadır (Gür ve Demirağ 2009). Gıda sanayinde kullanılan bazı şelat ajanlarının stabilite sabitleri Tablo 1.2'de verilmiştir.

Tablo 1.2: Metal şelatlarının stabilite sabitleri (Chambers 1993).

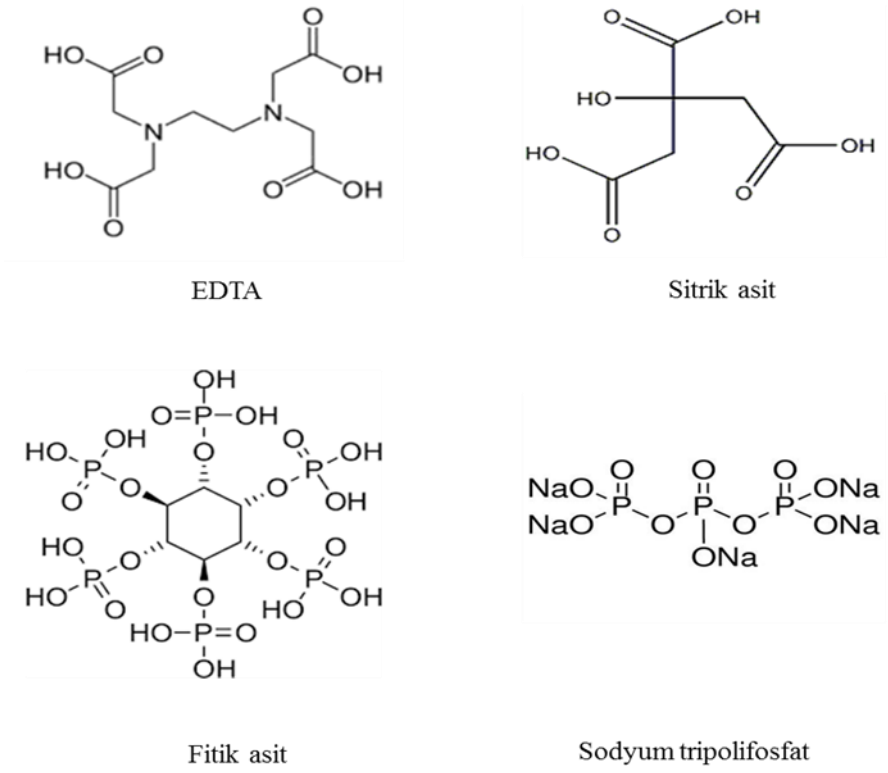
Şelat ajanı	**Na^{+1}**	**K^{+1}**	**Fe^{+2}**	**Fe^{+3}**	**Mg^{+2}**
EDTA	1.64	0.80	14.27	25.00	8.83
Sitrik asit	0.70	0.59	4.40	11.50	3.37
Fosforik asit	0.60	0.49	3.60	8.30	1.50
Tartarik asit	-	-	-	6.50	1.40
Glisin	-	-	-	10.00	2.20

-:Belirtilmemiştir.

Gıdaların yapısında bulunan polikarboksilik asitler (sitrik, malik, tartarik, okzalik ve suksinik asitler), polifosforik asitler (adenozin trifosfat, pirofosfat) ve yüksek yapılı moleküller (porfirinler, proteinler) doğal şelat özelliğindeki maddelerdir. Bu nedenle klorofilde bulunan magnezyum, enzimlerde bulunan bakır, demir, çinko ve manganez, proteinlerde bulunan demir ve hemoglobin ile miyoglobinin porfirin halkasında bulunan demir gibi pek çok metal iyonu, doğal olarak şelatlanmış halde bulunmaktadır. Bu tip iyonlar bazı hidrolitik ve diğer bazı parçalanma reaksiyonlarının sonucunda serbest hale geçtiklerinde gıdalarda renk değişimi, tatta acılaşma ve lezzet kaybı gibi bozulmalara neden olmaktadır. Bu

durumda serbest halde bulunan metal iyonu ile kompleks oluşturma ve buna bağlı olarak gıdalardaki bozulmaları önlemek amacıyla ortama şelat ajanı ilave edilmektedir (Gür ve Demirağ 2009, Arslan 2011).

Gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan şelat ajanları EDTA, sitrik asit ve tuzları, fitik asit ile fosfatlar olduğu bilinmektedir. Söz konusu şelat ajanlarının kimyasal yapısı Şekil 1.4'te gösterilmiştir. Fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 1.3'te verilmiştir.



Şekil 1.4: Şelat ajanlarının kimyasal yapıları

Şelat ajanları yaygın olarak gıda sanayinde antioksidan sinerjistleri olarak kullanılmaktadır. Kendileri antioksidan olmamakla birlikte, oksidasyonu katalizleyen metal iyonlarını ortamdan uzaklaştırmakta ve gıdalarda renk değişimi, oksidatif acılaşma gibi istenmeyen bozulmaları önlemektedir (Arslan 2011). Bu amaçla, et ürünlerinde fosfatlar su tutma kapasitesinin artırılması, pişirme kayıplarının azaltılması ve tekstürel özelliklerin geliştirilmesinin yanı sıra yaygın olarak kullanılmaktadır (Şimşek ve Kılıç 2017).

Tablo 1.3: Gıdalarda yaygın olarak kullanılan şelat ajanlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri (Nauta 1991, Sheftel 1995, Kumar ve diğ. 2010).

Şelat ajanı	Sınıfı	Kimyasal formülü	Molekül ağırlığı	Fiziksel formu	Çözünürlük (g/100 ml H_2O)
EDTA	Amino karboksilat	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	292.20	Beyaz toz	0.05
Sitrik asit	Hidroksi karboksilat	$C_6H_8O_7$	192.10	Renksiz kristal	160
Fitik asit	Polifosfatlar	$C_6H_{18}O_{24}P_6$	660.04	Beyaz toz	-
Sodyum tripolifosfat	Polifosfatlar	$Na_5P_3O_{10}$	367.90	Beyaz toz	73

-: Belirtilmemiştir.

Alkolsüz içeceklerde, asitliği düzenleyici olarak ilave edilen sitrik asit ve fosforik asit aynı zamanda metaller ile şelat oluşturarak, lezzet maddelerinin oksidasyonu ile renk bozulmasına neden olan reaksiyonların metaller tarafından katalizlenmesini engellemektedirler. Söz konusu şelat ajanları fermente malt içeceklere de bakır ile kompleks oluşturması için katkılanmaktadır. Bu tür içeceklerde ortamda serbest halde bulunan bakır, proteinlerle etkileşerek bulanıklığa neden olan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizlemektedir (Gür ve Demirağ 2009).

Sebzelerde, renk açma işleminden önce ilave edilen şelat ajanları, metal iyonların neden olduğu renk açılmalarını engellemekte, aynı zamanda kalsiyumu hücre duvarında bulunan pektik maddelerden uzaklaştırarak gevrekliği artırmaktadır (Gür ve Demirağ 2009). Şelat ajanlarından gıda sanayinde kıvam verici, jel yapıcı, stabilizör veya emülgatör olarak yaygın olarak kullanılan pektinin elma ve şeker pancarı gibi meyvelerden ekstrakte edilmesinden de yararlanılmaktadır (Arslan ve Aşan 1993, Renard ve Thibault 1993). Bu durumda şelat ajanı, meyvenin hücre duvarına kalsiyum çapraz bağlarıyla bağlı olan pektinin serbest hale geçmesini ve çözünürlüğünün artmasını sağlamakatadır (Van Buren 1991).

1.2.2.1 Gıdalarda Yaygın Olarak Kullanılan Şelat Ajanları ve Kullanım Amaçları

1.2.2.1.1 Sitrik Asit

Sitrik asit ve tuzları, gıdalarda asitliği düzenlemek amacıyla sıklıkla kullanılmakla birlikte, yüksek şelatlama özelliğiyle de dikkat çekmektedir. Sitrik asitin düşük pH'larda daha yüksek şelatlama özelliği gösterdiği bilinmektedir. Genel olarak güvenilir kabul edilen (Generally recognized as safe, GRAS) özellikte olan sitrik asit, deniz ürünlerinde askorbik asit ile daldırma çözeltisi halinde kullanıldığında acılaşmaya neden olan prooksidanlar ile şelat oluşturmakta ve bu şekilde bozulmaya neden olan enzimleri inaktif hale getirebilmektedir. Sitrik asit meyve ve sebzelerde kullanıldığı zaman da benzer bir etki göstermektedir. Eritorbik asit ve sodyum eritorbat gibi antioksidanlar ile birlikte kullanıldığında renk ve lezzet bozulmalarını önleyebilmektedir (Gür ve Demirdağ 2009, FDA 2017).

Sitrik asit ortamın ya da hücre içinin pH'sını düşürerek veya hücre zarının geçirgenliğini değiştirip substrat taşınımını bozarak ya da mikroorganizmaların yaşamı için gerekli bazı mineral maddelerle şelat oluşturarak antimikrobiyal etki göstermektedir (Coşkun 2006). Sitrik asit ile *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yapılan çalışmalarda, sitrik asitin *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Shigella sonnei* vb. birçok bakteri türüne karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Kim ve Rhee 2015, Akbas ve Cag 2016, Chai ve diğ. 2016, Oh ve diğ. 2016, Battisti ve diğ. 2017, Wu ve diğ. 2017).

Sitrik asit yalnızca bakteriler üzerine değil bazı maya ve küf türleri üzerine de antimikrobiyal etki göstermektedir (Doležalová ve diğ. 2010). Shokri ve diğ. (2011) *in vitro* koşullarda gerçekleştirdikleri çalışmalarında sitrik asit ve tartarik asitin bazı maya (*Candida albicans* vb.) ve küf (*A. fumigatus* vb.) türlerine karşı antifungal etkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda sitrik asitin tartarik asite göre daha güçlü fungusidal ve fungustatik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, sitrik asitin küflere mayalardan daha fazla inhibitör etki gösterdiğini ifade etmişlerdir. El-Sharkawy ve diğ. (2016) salatalıkta sitrik asitin *F. oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* küfünün neden olduğu kök ve gövde çürüklüğü hastalığını azalttığını belirtmişlerdir.

Literatürde sitrik asitin aflatoksin oluşumuna neden olan *A. parasiticus*'un gelişimi ve toksin üretimini *in vitro* (Chourasia 1993) ve *in vivo* koşullarda (Reiss 1976, Gowda ve diğ. 2004, Singh ve Mandal 2014) engellediğine dair çalışmalar da mevcuttur. Ayrıca sitrik asitin antep fıstığı (Rastegar ve diğ. 2017), soya fasulyesi (Lee ve diğ. 2015), pirinç (Safara ve diğ, 2010) ve mısırdaki (Mendez-Albores ve diğ. 2005) mevcut aflatoksinler ile sorgum (Mendez-Albores ve diğ. 2009) ve ördek yemindeki (Mendez-Albores ve diğ. 2007) mevcut aflatoksinleri parçalamakta da etkili olduğu bulunmuştur.

1.2.2.1.2 Fitik Asit

Fitik asit, birçok bitki tohumunun yapısında nispeten yüksek oranlarda (%1-3) bulunabilmektedir. Fitik asitin orta ve yüksek düzeylerdeki pH'larda mineral maddeleri –özellikle de çinko ve demiri- yüksek oranda bağlama kapasitesi nedeniyle tahıl ürünlerinin vücutta biyo-yararlılığını azaltıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Şat ve Keleş 2004). Bunun yanı sıra, fitik asitin minerallerle birleşmesiyle oluşan fitatlar, protein ve yağ emilimini de olumsuz yönde etkilemektedir (Kumar ve diğ. 2010).

GRAS özellikte olan fitik asit iyi bir antioksidan olarak bilinmektedir. Askorbik asit oksidasyonunu inhibe etmekte, katı ve sıvı yağlarda peroksitlenme ile hidrolizi önlemektedir. Gıdalara katılan fitik asit et, ekmek, salata ve balığı korumakta, doğal ve yapay renk maddelerini stabilize etmektedir. Taze sebzelerin renklerinin bozulmasını engellemekte, besleyici kalitelerini artırmakta ve raf ömürlerinin uzatılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca fitik asit, gıda sanayinde sarımsağın deodorizasyonunda, yenilebilir kollagen sosis kılıflarının ve yüksek protein içeriğine sahip lifli kurutulmuş sebzelerin yeniden yapılanma sürelerini azaltma gibi amaçlarla da kullanılmaktadır (Gür ve Demirdağ 2009, FDA 2012).

Fitik asitin antimikrobiyal etkisinin incelendiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar mevcuttur. Söz konusu çalışmalarda fitik asit *E. coli* ve *L. monocytogenes* gibi bazı bakteri türlerinin gelişimini önlemede etkili bulunmuştur (Bari ve diğ. 2005, Kim ve Rhee 2016). Fitik asitin küf gelişimi ve toksin oluşumu üzerine etkisini inceleyen çalışmalar da vardır. Gupta ve Venkitasubramanian (1975) otoklavlanmış soya

fasulyesi tohumunda aflatoksin üretiminin otoklavlanmamış örneklere göre daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Yazarlar bu durumun, ısıl işlemle fitik asitin yapısının parçalanması ve ortamdaki çinkonun toksin üreticisi küf tarafından kullanılabilir hale gelmesinden kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Çinko ve fitik asit ilavesiyle gerçekleştirilen deneyler de bu tezi doğrulamıştır. Fitik asit ilavesi (6 mg/ml) aflatoksin üretimini %87 oranında azaltmıştır. Holmes ve diğ. (2008) *A. flavus*'un aflatoksin üretiminin düşük fitik asit içeriğine sahip mısır embriyosu ekstraktında, normal tane ekstraktlarına göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak, benzer konularda çalışan diğer araştırıcılar, tamamen farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Örneğin, Hensarling ve diğ. (1983) ortama ilave edilen çinko ile aflatoksin üretiminin inhibe, fitik asit ile teşvik edildiğini bildirmiştir. Ehrlich ve Ciegler (1985) ortama ilave edilen 33 µg/g fitik asidin aflatoksin üretimini pamuk tohumlarında 5 kat azalttığını soya fasulyelerinde ise etkilemediğini bildirmiştir. Elde edilen bu çelişkili sonuçlar, fitik asidin küf gelişimi ve toksin oluşumu üzerine etkisinin kullanılan substrata, şelat ajanının dozuna ve ortam koşullarına bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

1.2.2.1.3 EDTA

EDTA oldukça yaygın düzeyde kullanılan bir şelat ajanıdır. Yapısında bulunan azot ve oksijen atomlarının yardımıyla farklı metaller ile kuvvetli şelatlar meydana getirmektedir. Maksimum şelat etkisi karboksil gruplarının ayrıştığı yüksek pH'larda görülmektedir. GRAS özellikte olan EDTA gıda katkı maddesi olarak yemeklik katı ve sıvı yağlarda, emülsifiye katı ve sıvı yağ içeren mayonez ve soslarda, içeceklerde (çay, kahve, meyve ve sebze suları), meyve ve sebze konservelerinde, ısıl işlem görmüş et ürünlerinde ve deniz ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle de konserve ve deniz ürünlerinde, metal iyonlarının neden olduğu renk koyulaşması, tatta bozulma gibi istenmeyen reaksiyonların önüne geçmek için kullanılır. Yüksek şelatlama kapasitesine sahip olan EDTA'nın vücutta bazı minerallerin azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, gıdalarda kullanım miktarı çeşitli düzenlemelerle sınırlandırılmıştır (Gür ve Demirdağ 2009, FDA 2015). Örneğin; Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre kalsiyum disodyum EDTA'nın teneke veya cam ambalajdaki meyve sebzelerde

maksimum 250 mg/kg, işlenmiş balık ve su ürünlerinde 75 mg/kg kullanılması önerilmektedir (Anonim 2013).

Günümüzde çeşitli gıdalarda kullanılan EDTA'nın Gıda Katkı Maddeleri için Ortak Uzman Komitesi (JECFA) tarafından günlük alınmasına izin verilen miktar (ADI: acceptable daily intake) serbest asit formu için 1.9 mg/kg vücut ağırlığı, gıda katkı maddesi olarak kullanılan kalsiyum disodyum asetat formu için 2.5 mg/kg vücut ağırlığı olarak tespit edilmiştir. Deney hayvanlarında toksik etkiye neden olan en düşük EDTA dozu 750 mg/kg/gün olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda EDTA'nın sitotoksik ve az miktarda genotoksik etkisi olduğu, ancak karsinojenik etkisi olmadığı belirtilmiştir. Ağız yoluyla alınan fazla dozda EDTA'nın hayvanların üreme ve gelişim faaliyetlerini olumsuz yönde etkilediği ortaya konmuştur (Lanigan ve Yamarik 2002, JECFA 2007). Bu etkilerinin yanı sıra EDTA'nın vücudumuzdaki esansiyel metalleri bağlayarak metal eksikliklerine özellikle de çinko eksikliğine yol açtığı gibi, toksik metalleri de bağladığı hatta metal zehirlenmesi tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. (WHO 2003, Wreesmann 2014).

EDTA gıdalarda yaygın olarak şelat ajanı, antioksidan, emülsifiyer ve stabilizatör, renk ve aroma koruyucu madde olarak kullanılmasının yanı sıra farklı amaçlarda ve farklı alanlarda da kullanılabilmektedir. Örneğin; EDTA'dan biyosürfektan üretiminde (Hua ve diğ. 2007, Joshi ve diğ. 2007, Yılmaz ve diğ. 2010) ve mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerin aktivitesini belirlemek amacıyla (Erkan 2014, Soyal 2014, Çakar 2016) yararlanılmaktadır.

EDTA antimikrobiyal etkisinden dolayı gıda sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. EDTA'nın genellikle Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği ancak Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. EDTA, Gram negatif bakteriler üzerinde üç şekilde etki göstermektedir. Birincisi, bakterinin stoplazmik membranındaki metal iyonlarıyla şelat oluşturarak membranın yapısına zarar vermektedir. Bakterinin membranındaki katyonlarla özellikle de Gram negatif bakterilerin dış membranında Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları ile birleşerek membranın lipopolisakkarit yapısının bozulmasına neden olmaktadır. İkincisi, bakteri yapısındaki nükleotidleri ve RNA'yı olumsuz yönde etkilemektedir. Üçüncü ve son olarak ise bakterinin lag periyodunu uzatmaktadır (Kaba ve Duyar 2008, Yiğit 2008).

EDTA'nın hasat sırasında ve sonrasında meyve sebzelerde ciddi problemlere yol açabilen *Aspergillus* spp*, Penicillium* spp*, Fusarium* spp vb. küf türlerine karşı antifungal etki gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Abrunhosa ve Venancio 2008, Askarne ve diğ. 2013, Türkkan ve Erper 2015). EDTA'nın tek başına antifungal madde olarak kullanılabildiği gibi sorbik asit ve propiyonik asit gibi antifungal maddelerle ya da amfoteresin B ve nistatin gibi antifungal ilaçlarla söz konusu maddelerin antifungal etkisini artırmak amacıyla bazı maya (*Candida* spp vb.) ve küf türlerine karşı kullanıldığı bildirilmiştir (Razavi-Rohani ve Griffiths 1999, Ruhil ve diğ. 2013, Ruhil ve diğ 2014).

Literatürde *in vitro* koşullarda EDTA'nın mikotoksin üretimini geciktirdiğine ya da mevcut mikotoksinleri parçalamada etkili olduğuna dair çalışmalar vardır. D'souza ve Brackett (2001) EDTA'nın ortama 1 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda ilave edilmesiyle *Flavobacterium aurantiacum* tarafından degrade edilen aflatoksin B_1'in miktarını artırdığını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, yaptıkları diğer bir çalışmada 10 mM EDTA'nın degrade edilen toksin miktarını önemli düzeyde artırdığını tespit etmişlerdir (D'souza ve Brackett 2000). Abrunhosa ve Venancio (2008) tarafından yapılan çalışmada ise 10 mmol/l disodyum EDTA'nın *A. niger* tarafından üretilen okratoksin A'nın üretimini geciktirdiğini ve 25°C'de 8 günlük inkübasyon süresinin sonunda toksin miktarını yaklaşık %99 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Tarafımızdan yapılan literatür araştırması göstermiştir ki; gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan şelat ajanlarından sitrik asit, fitik asit ve EDTA'nın küf gelişimi ve toksin oluşumunu önlemede etkisi söz konusudur. Ancak bu etki; küf türü, küfün gelişimi için kullandığı substratın bileşimi, şelat ajanı konsantrasyonu ve şelatlama yeteneği gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu tez çalışmasında, öncelikle küfün gelişimi için ihtiyaç duyduğu mineral madde/maddeler besiyeri ortamında belirlenmiştir. Besiyeri bileşimi, hem küf gelişimi ve toksin oluşumu hem de ajanların şelatlama yeteneğini ortaya koymaları adına önemli bir faktördür. Bu yüzden çalımamızda, farklı besiyerleri kullanılarak küfün en iyi/hızlı hangi besiyerinde geliştiği ve ne kadar aflatoksin ürettiği tespit edilmiştir. Ardından, şelat ajanı çalışmalarına geçilmiştir. Farklı besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda

katkılanan sitrik asit, fitik asit ve EDTA şelat ajanlarının küf gelişimi ve toksin oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir.

2. YÖNTEM

2.1 *A. flavus*'un Gelişme Koşulları ve Muhafazası

Çalışmamızda incelenen küf türü, ülkemizin en önemli incir üreticisi bölgesi olan Ege Bölgesi'ndeki genel florada baskın olduğu önceki çalışmalarla belirlenmiş (Aşkın ve Köşker 1976, Demir ve diğ. 1990) *A. flavus* olarak seçilmiştir. Deneylerde kullanılan *A. flavus* (MAM-200682) TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gıda Enstitüsü'ndeki kültür kolleksiyonundan temin edilmiştir (Ozcakmak ve diğ. 2010). Küf izolatı, analizlerde kullanılıncaya kadar saf kültür halinde %60'lık gliserol içerisinde -70°C'de saklanmıştır. Analizlerde kullanılacak izolat, Potato dextrose agar besiyerinde aktive edilmiştir.

2.2 *A. flavus* Suşunun Teşhisi ve Doğrulanması

A. flavus küf izolatının tanımlanmasında Hamed ve diğ. (2016)'nin önerdiği yöntem kullanılmıştır. Bu yönteme göre; küf kolonileri steril bir öze yardımıyla alınmış ve Potato dextrose agar (PDA; Neogen, 7149A), Sabouraud dextrose agar (SDA; Neogen, 7150A), Malt extract agar (MEA; Neogen, 7456A) ve Czapek-dox agar (CZA; Merck, 105460) besiyerleri üzerindeki üç noktaya ekimleri ('üç nokta ekim' tekniği) yapılmıştır. Petri kutuları 30°C'de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda, petri kutularındaki her bir besiyeri için farklı renkteki küf kolonilerinin renkleri ve küfün mikroskobik yapısı incelenmiştir. Deney sonucunda elde edilen bulgular literatürdekilerle karşılaştırılmış ve bundan sonraki analizlerde kullanılacak küf izolatı *A. flavus* doğrulanmıştır.

2.3 Mineral Maddelerin *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

2.3.1 Analizlerde Kullanılan Besiyeri

Çalışmamızda, incelenecek mineral maddeleri ayrı ayrı birer komponent (bileşen) olarak ihtiva eden bir besiyerinin kullanımı gereklidir. Bu amaçla, küf gelişiminin izlenmesi için tercih edilen bir besiyeri olan CZA besiyeri model olarak kullanılmıştır (Badii ve diğ. 1986, Özcan 1998, Gautam ve Bhadauria 2012). Söz konusu besiyerinin bileşimi aşağıda Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4: CZA besiyerinin bileşimi (Anonim 2018).

Bileşen	**Miktar (g/100 ml)**
Sukroz	3
Sodyum nitrat [$NaNO_3$]	0.3
Magnezyum sülfat heptahidrat [$MgSO_4.7H_2O$]	0.1
Demir(III)sülfat pentahidrat [$Fe_2(SO_4)_3.5H_2O$]	0.0012
Potasyum klorür [KCl]	0.05
Potasyum fosfat monobazik [KH_2PO_4]	0.125
Agar-agar	1.3

2.3.2 Modifiye Besiyeri Ortamlarını Oluşturan Bileşenlerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Modifiye besiyerlerini oluşturan $NaNO_3$ (Merck, 106535), $MgSO_4.7H_2O$ (Scharlau, MA00841000), KCl (Sigma-Aldrich, 746436) ve KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, 04243) bileşenlerinin %1'lik, $Fe_2(SO4)_3.5H_2O$ (Fisher Scientific, 1/1160/53) bileşeninin ise %0.5'lik stok çözeltisi balon jojeler içerisinde hazırlanmıştır. Tüm stok çözeltiler ertesi gün kullanılıncaya kadar buzdolabında (+4˚C'de) muhafaza edilmiştir.

2.3.3 Modifiye Besiyeri Ortamlarının Hazırlanması

A. flavus küfünün mineral maddelere bağlı olarak gelişimi CZA besiyeri esas alınarak hazırlanan modifiye besiyerlerinde takip edilmiştir. Söz konusu besiyerlerinde küfün, sodyum kaynağı olarak $NaNO_3$, magnezyum kaynağı olarak $MgSO_4.7H_2O$, demir kaynağı olarak $Fe_2(SO4)_3.5H_2O$ ve potasyum kaynağı olarak KCl ve/veya KH_2PO_4 mineral bileşiklerini kullanacağı düşünülmüştür. Çalışmamızda; küfün gelişimi için hangi mineral maddeye ihtiyaç duyduğunun tespit edilmesi amacıyla, test edilecek bileşen besiyeri bileşiminden çıkarılarak modifiye besiyerleri hazırlanmıştır. Besiyeri ortamında yapılan modifikasyonlar Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.5: Besiyerlerinin mineral madde içeriğinde yapılan modifikasyonlar

Hazırlanan besiyeri	**Besiyeri kodu**	**Besiyerinde yapılan modifikasyon**
Hazır temin edilen CZA	Kontrol I	-
Hazırlanan CZA	Kontrol II	-
$NaNO_3$ içermeyen CZA	Na-modifiye	Besiyeri bileşimine $NaNO_3$ ilave edilmemiştir.
$MgSO_4.7H_2O$ içermeyen CZA	Mg-modifiye	Besiyeri bileşimine $MgSO_4.7H_2O$ ilave edilmemiştir.
$Fe_2(SO_4)_3.5H_2O$ içermeyen CZA	Fe-modifiye	Besiyeri bileşimine $Fe_2(SO4)_3.5H_2O$ ilave edilmemiştir.
KCl içermeyen CZA	K-modifiye I	Besiyeri bileşimine KCl ilave edilmemiştir.
KH_2PO_4 içermeyen CZA	K-modifiye II	Besiyeri bileşimine KH_2PO_4 ilave edilmemiştir.

Besiyerleri hazırlanırken, $NaNO_3$, $MgSO_4.7H_2O$, $Fe_2(SO4)_3.5H_2O$, KCl, ve KH_2PO_4 besiyeri ortamına çözelti halinde ilave edilmiş, sukroz (Caisson Laboratories, S011) ve agar-agar (Sigma-Aldrich, 05039) ise tartılarak ilave edilmiştir. Kontrol I besiyerinin hazırlanmasında ise CZA'ın kendisi hazır olarak temin edildiğinden, gerekli miktarda tartılıp saf su içinde çözündürülmüştür. Besiyerleri son hacmi 200 ml olacak şekilde otoklavlanabilir cam şişeler içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan modifiye besiyerlerinin bileşimi Tablo 2.6'da verilmiştir. Tüm besiyerleri otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilize edilen

besiyerleri dökme sıcaklığına düşünce (40-50°C) 90 mm çapa sahip steril plastik petri kaplarına dökülmüştür. Her bir besiyeri için 5 petri kabı kullanılmıştır.

Tablo 2.6: Mineral madde içeriği modifiye edilmiş besiyerlerinin hazırlanması*

Hazırlanan besiyerleri	**Besiyeri bileşenleri**							
Besiyeri kodu	**Sukroz**	**$NaNO_3$****	**$MgSO_4.7H_2O$****	**$Fe_2(SO_4)_3.5H_2O$*****	**KCl****	**KH_2PO_4****	**Agar-agar**	**Saf su**
Kontrol II	6 g	60 ml	20 ml	10 ml	480 µl	25 ml	2.6 g	85 ml
Na-modifiye	6 g	-	20 ml	480 µl	10 ml	25 ml	2.6 g	145 ml
Mg-modifiye	6 g	60 ml	-	480 µl	10 ml	25 ml	2.6 g	105 ml
Fe-modifiye	6 g	60 ml	20 ml	-	10 ml	25 ml	2.6 g	85 ml
K-modifiye I	6 g	60 ml	20 ml	480 µl	-	25 ml	2.6 g	95 ml
K-modifiye II	6 g	60 ml	20 ml	480 µl	10 ml	-	2.6 g	110 ml

* Kontrol I besiyeri, her bir bileşenin besiyeri ortamına ilavesiyle oluşturulmadığı için tabloda gösterilmemiştir.
** Söz konusu bileşiğin %1'lik stok çözeltisinden besiyerine ilave edilen miktar.
*** Söz konusu bileşiğin %0.5'lik stok çözeltisinden besiyerine ilave edilen miktar.

2.3.4 Modifiye Besiyerlerinde pH Ölçümü

Modifiye besiyerlerinin pH'sı sterilizasyon işleminden sonra potansiyometrik olarak pH-metre (HI 2211 pH/ORP Meter, HANNA Instruments, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Hazırlanan besiyerlerinin her birinden 2'şer kez ölçüm alınmıştır.

2.3.5 Modifiye Besiyeri Ortamlarında *A. flavus* Gelişiminin Takibi

Modifiye besiyerlerinde *A. flavus* gelişiminin izlenmesinde Karaca ve diğ. (2014) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu yönteme göre; 7 günlük *A. flavus* izolatı, sterilize edilmiş bir pastör pipetinin arka kısmı (9 mm çapında) kullanılarak, modifiye edilmiş besiyerlerine aktarılmıştır. Steril bir bistüriyle alınan ve küf misellerini içeren "besiyeri parçacığı", içinde modifiye besiyerleri bulunan petri kutularının tam ortasına ters çevrilerek yerleştirilmiştir. Böylece, küf misellerinin besiyeri ortamına temas etmesi sağlanmıştır. Her bir besiyeri için 5 petri kabı kullanılmıştır. Söz konusu petri kutuları 30°C'ye ayarlanmış inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ön-denemeler sonucu tespit edildiği üzere inkübasyonun 2, 4 ve 6. günlerinde küf koloni çapı ölçülmüştür. Küf koloni çapı ölçümü petri kutusunun arka yüzeyine çizilen 2 dik düzlemde yapılmıştır. Ölçümlerin ortalaması alınmıştır. Sonuçlar mm olarak verilmiştir. Petri kutusunun ölçülebilen çapı 85 mm ve küf izolatını besiyerine aktarmak için kullanılan pastör pipetinin arka kısmının çapı 9 mm olduğundan dolayı, besiyerinde ölçülen maksimum koloni çapı değeri 85-9=76 mm'dir.

2.3.6 *A. flavus* Gelişimi Üzerine Sodyum ve Nitratın Etkisinin İncelenmesi

Küf gelişimine CZA besiyeri bileşiminde bulunan $NaNO_3$ bileşeninin etkisinin Na fraksiyonundan mı yoksa nitrat NO_3 fraksiyonundan mı kaynaklandığını ortaya koymak için besiyeri bileşimindeki $NaNO_3$ yerine sodyum sülfat (Na_2SO_4; Scharlau, SO06671000) veya potasyum nitrat (KNO_3; Merck, 105063) bileşikleri

kullanılarak modifiye besiyerleri hazırlanmıştır. Besiyeri ortamına Na_2SO_4 ve KNO_3 tartılıp ilave edilmiştir. Diğer bileşenler çalışmamızın "2.3.3 Modifiye Besiyeri Ortamlarının Hazırlanması" başlıklı bölümünde açıklandığı gibi ise çözelti halinde besiyeri ortamına katkılanmıştır. Besiyerleri son hacmi 200 ml olacak şekilde otoklavlanabilir cam şişeler içerisinde hazırlanmıştır. Söz konusu besiyerlerinde yapılan modifikasyonlar ve besiyerlerinin bileşimi sırasıyla Tablo 2.7 ve 2.8'de verilmiştir. Hazırlanan tüm besiyerleri otoklavda 121˚C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilize edilen besiyerleri dökme sıcaklığına düşünce (40-50°C) petri kaplarına dökülmüştür. Her bir besiyeri için 5 petri kabında, Karaca ve diğ. (2014) tarafından önerilen yöntem kullanılarak *A. flavus* gelişimi takip edilmiştir. 30°C'de gerçekleştirilen inkübasyonun 2, 4 ve 6. günü küf koloni çapı ölçülmüştür.

Tablo 2.7: Besiyeri bileşimindeki sodyum ve nitrat franksiyonunda yapılan modifikasyolar

Hazırlanan besiyeri	**Besiyeri kodu**	**Besiyerinde yapılan modifikasyon**
$NaNO_3$ içeren CZA	Kontrol	-
$NaNO_3$ içermeyen CZA	Na-modifiye I	Besiyeri bileşimine $NaNO_3$ ilave edilmemiştir.
$NaNO_3$ yerine Na_2SO_4 içeren CZA	Na-modifiye II	Besiyeri bileşimine $NaNO_3$ yerine "sodyum kaynağı olarak" Na_2SO_4 ilave edilmiştir.
$NaNO_3$ yerine KNO_3 içeren CZA	Na-modifiye III	Besiyeri bileşimine $NaNO_3$ yerine "nitrat kaynağı olarak" KNO_3 ilave edilmiştir.

Tablo 2.8: Besiyerindeki sodyum ve nitrat franksiyonu modifiye edilen besiyerlerinin hazırlanması

Hazırlanan besiyerler	**Besiyeri bileşenleri**									
Besiyeri kodu	**Sukroz**	**$NaNO_3$***	**Na_2SO_4**	**KNO_3**	**$MgSO_4.7H_2O$***	**KCl***	**$Fe_2(SO_4)_3.5H_2O$****	**KH_2PO_4***	**Agar-agar**	**Saf su**
Kontrol	6 g	60 ml	-	-	20 ml	10 ml	480 µl	25 ml	2.6 g	85 ml
Na-modifiye I	6 g	-	-	-	20 ml	10 ml	480 µl	25 ml	2.6 g	145 ml
Na-modifiye II	6 g	60 ml	1 g	-	-	10 ml	480 µl	25 ml	2.6 g	145 ml
Na-modifiye III	6 g	60 ml	-	0.72 g	20 ml	10 ml	-	25 ml	2.6 g	145 ml

* Söz konusu bileşiğin %1'lik stok çözeltisinden besiyerine ilave edilen miktar.
** Söz konusu bileşiğin %0.5'lik stok çözeltisinden besiyerine ilave edilen miktar.

2.4 Farklı Besiyerlerinde *A. flavus* Gelişiminin Takibi

Çalışmamızda; *A. flavus*'un en iyi/hızlı hangi besiyerinde gelişim gösterdiğini belirlemek amacıyla, küfün CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerinde gelişimi takip edilmiştir.

2.4.1 Kuru İncirden Besiyeri Hazırlama

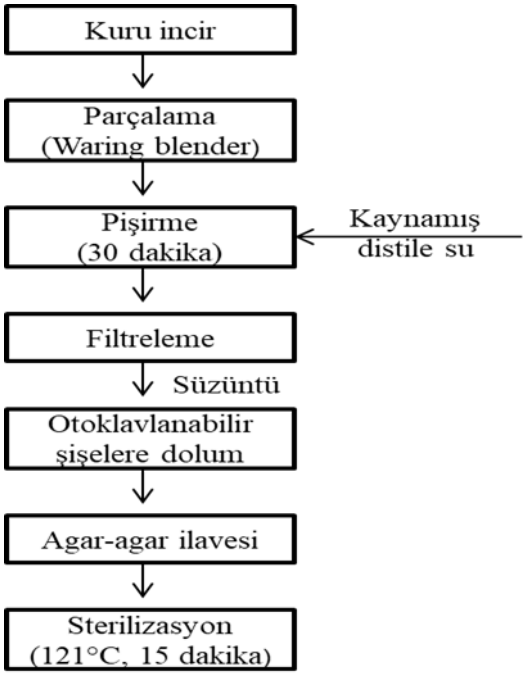
Çalışmada, López-Malo ve diğ. (1995) önerdiği yöntem ve PDA besiyerinin bileşimi temel alınarak kuru incirden besiyeri hazırlanmıştır. Küf gelişiminin izlenmesinde yaygın olarak kullanılan PDA besiyerinin bileşimi patates infüzyonu, glukoz ve agar-agar'dan oluşmaktadır. Bu besiyerinde; küf, gelişimi için ihtiyaç duyduğu maddeleri (mineral maddeler vb.) patates infüzyonundan sağlamaktadır. PDA besiyerinin bileşimi Tablo 2.9'da verilmiştir.

Tablo 2.9: PDA besiyerinin bileşimi (FDA 2001).

Bileşen	Miktar
Patates infüzyonu	200 g
Glukoz	20 g
Agar-agar	20 g
Saf su	1 l

Kuru incirden besiyeri hazırlanırken, PDA besiyerinde kullanılan patates infüzyonu yerine kuru incir kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan kuru incirler aflatoksin kontrolünden geçmiş ve paketlenmiş ürünler halinde Denizli piyasasından temin edilmiştir. Buna ilaveten; besiyerine, PDA besiyerinde olduğu gibi agar-agar ve saf su ilave edilmiştir. İncir meyvesi yüksek düzeyde şeker içerdiğinden besiyerine glukoz ilave edilmemiştir. Yapılan ön-denemelerde besiyeri hazırlanırken farklı miktarlarda (150, 200 ve 250 g) kuru incir meyvesi kullanılmış ve hazırlanan besiyerlerinde *A. flavus* gelişimi izlenmiştir. İnkübasyonun 2, 4 ve 6. günlerinde ölçülen küf koloni çapı sonuçlarının birbirinden farklı olmamasından dolayı besiyerinin hazırlanmasında kullanılan her bileşenin miktarının PDA besiyerininki

ile aynı olmasına karar verilmiştir. Söz konusu besiyeri hazırlanırken 200 g kuru incir parçalanmış ve 30 dakika boyunca 1 l kaynamış distile su içerisinde pişirilmiştir. Ardından gıdalar için uygun ağartılmamış tülbent bezi yardımıyla filtreleme işlemi yapılmıştır. Elde edilen süzüntüye agar- agar ilave edilmiştir. Kuru incirden hazırlanan besiyerinin iş akım şeması Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5: Kuru incirden hazırlanan besiyerinin iş akım şeması

Hazırlanan besiyeri 5 petri kabına dökülmüş ve *A. flavus* gelişimi takip edilmiştir (Karaca ve diğ. 2014). 30°C'de inkübasyona bırakılan petri kutularında inkübasyonun 2, 4 ve 6. günü küf koloni çapı ölçülmüştür.

2.5 Farklı Besiyerlerine Katkılanan Şelat Ajanlarının *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Çalışmamızda besiyeri ortamına ilave edilen şelat ajanlarının ortamdaki mineral maddeleri bağlayarak küf gelişimini ve toksin oluşumunu önlemesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, üç farklı besiyeri ve şelat ajanı kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan besiyerleri CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyeridir. Şelat ajanları ise, gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan şelat ajanlarından sitrik asit (Scharlau, AC07251000), fitik asit (Acros Organics, 235370010, %50'lik sulu

çözelti) ve EDTA (Fisher Scientific, 10011123)'dır. Ayrıca şelat ajanı olarak EDTA'nın suda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle bu bileşiğin disodyum tuzu (Na_2-EDTA, Bioshop, EDT002.500) bazı deneyler kapsamında kullanılmıştır.

2.5.1 Şelat Ajanlarının Besiyeri Ortamına Katkılanması

Gerçekleştirilen ön-denemelerde şelat ajanlarının etkili dozlarının belirlenmesinde CZA besiyerinin bileşiminde bulunan $NaNO_3$ bileşeninin miktarı esas alınmıştır. Söz konusu bileşenin besiyeri ortamındaki konsantrasyonu milimolar (mM) cinsinden hesaplanmış ve besiyeri ortamına bu miktarın 0.005-0.25 katı katkılanmıştır. Bu durumda, deneylerde kullanılacak şelat ajanlarının dozları sitrik asit ve EDTA için 0.175, 0.875 ve 1.75 mM olarak belirlenirken, fitik asit için 0.175, 0.438 ve 1.75 mM olarak belirlenmiştir. Şelat ajanları belirlenen dozlarda CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerine katkılanmıştır. Na_2-EDTA'nın çözünürlüğünün EDTA'ya göre daha yüksek olduğu bilinmektedir. EDTA ve Na_2-EDTA'nın suda çözünürlüğü sırasıyla 0.5 g/l (25°C'de) ve 100 g/l (20°C'de)'dir (Sheftel 1995). Bu nedenle, Na_2-EDTA yalnızca kuru incirden hazırlanan besiyeri bileşimine daha yüksek konsantrasyonlar olan 1.75, 3.50, 7.00 ve 8.75 mM düzeylerinde katkılanmıştır. Şelat ajanlarından sitrik asit ve fitik asit besiyerine çözelti halinde ilave edilmiştir. Bunun için sitrik asitin %1'lik stok çözeltisi kullanılmıştır. EDTA ve Na_2-EDTA ise gerekli miktarlarda tartılıp besiyeri ortamına dahil edilmiştir. Tüm besiyerleri otoklavlanabilir cam şişeler içerisinde son hacim 200 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Deneylerde kontrol grubu olarak şelat ajanı katkılanmamış besiyerleri kullanılmıştır.

2.5.2 Şelat Ajanı Katkılı Besiyerlerinde pH Ölçümü

Şelat ajanı katkılı besiyerlerin pH'sı sterilizasyon işleminden sonra potansiyometrik olarak pH-metre kullanılarak ölçülmüştür. Hazırlanan besiyerlerinin her birinden 3'er kez ölçüm alınmıştır.

2.5.3 Şelat Ajanı Katkılı Besiyerlerinde *A. flavus* Gelişiminin Takibi

Hazırlanan şelat ajanı katkılı besiyerlerinin otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmesinin ardından Karaca ve diğ. (2014) tarafından önerilen yöntem kullanılarak küf gelişiminin takibi yapılmıştır. Bu amaçla 30°C'de inkübasyona bırakılan petrilerde inkübasyonun 2, 4 ve 6. günü küf koloni çapı ölçülmüştür. Çalışmamızda, her bir şelat ajanının dozu 5 petri kabı kullanarak analiz edilmiştir. Kontrol grubu besiyerlerinde gelişen küf kolonisinin çaplarının ortalaması (dc) ve şelat ajanı katkılı besiyerlerinde gelişen küf kolonisinin çaplarının ortalaması (dt) yardımıyla %inhibisyon değeri (4.1) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

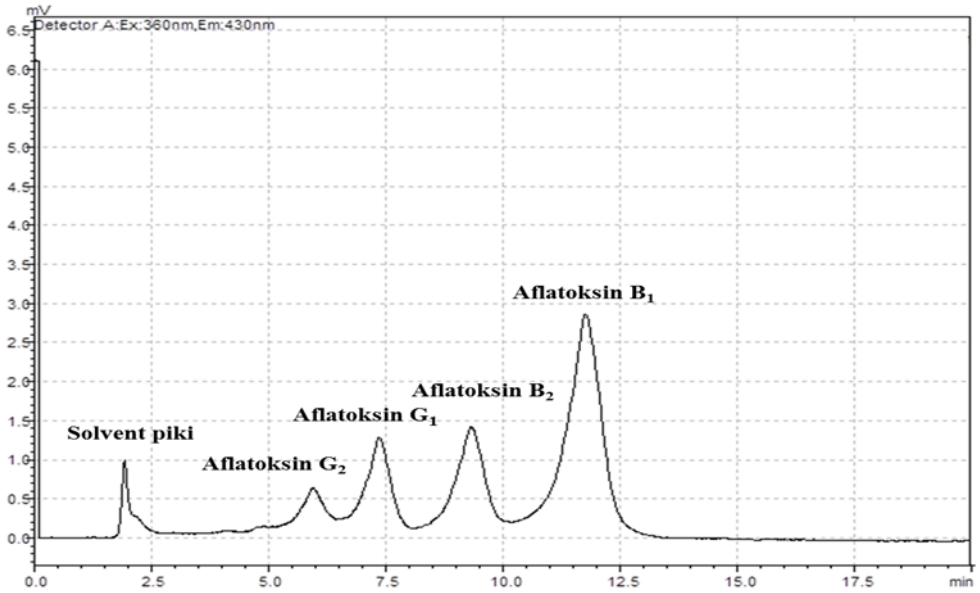
$$\%\text{İ}nhibisyon = \frac{dc - dt}{dc} x100 \quad (4.1)$$

2.6 Besiyeri Örneklerinde Aflatoksin Analizleri

Literatürde *A. flavus* küfünün aflatoksin üretimi için gerekli optimum sıcaklık değerinin 20-35°C aralığında olduğu bildirilmiştir (Schindler ve diğ. 1967, Schroeder ve Hein 1967, Ogundero 1987). Diener ve Norman (1977) *A. flavus*'un 30°C'de 5-7 günde maksimum düzeyde aflatoksin ürettiğini ifade etmişlerdir. Diğer araştırmacılar ise, ortamdaki diğer şartlara da (substratın bileşimi, nisbi nem, ortamın gaz komposizyonu vb.) bağlı olarak *A. flavus*'un 25°C'de 21 günde maksimum düzeyde aflatoksin ürettiğini tespit etmişlerdir (Ellis ve diğ. 1994). Literatürden elde ettiğimiz bu bilgiler doğrultusunda; çalışmamızda yapılan ön-denemeler sonucunda, 30°C'de gerçekleştirdiğimiz inkübasyonun 21. gününde, modifiye edilmiş CZA besiyerlerinde ve şelat ajanlarının katkılandığı CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerlerinde aflatoksin analizleri yapılmıştır. Gerçekleştirilen aflatoksin analizleri ile, besiyeri ortamındaki mineral maddelerin ve şelat ajanların toksin oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca çalışmamızda CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerinde de aflatoksin analizleri yapılmış ve küfün hangi besiyerinde daha fazla aflatoksin ürettiği tespit edilmiştir.

2.6.1 Aflatoksin Standart Çözeltisinin Hazırlanması

Aflatoksin standardı olarak, mililitresinde 1 µg aflatoksin B_1, 0.29 µg aflatoksin B_2, 0.99 µg aflatoksin G_1 ve 0.27 µg aflatoksin G_2 bulunan 1 ml metanol içerisinde çözünmüş toplam aflatoksin standart çözeltisi (Supelco, Bellefonte, PA, USA) kullanılmıştır. Aflatoksinler sabit akış hızındaki geliş zamanları tespit edilerek bulunmuştur. Şekil 2.6'da içerisinde 2 ppb aflatoksin B_1, 0.58 ppb aflatoksin B_2, 1.98 ppb aflatoksin G_1 ve 0.54 ppb aflatoksin G_2 bulunduran aflatoksin standart çözeltisinin oluşturduğu kromatogramda görüldüğü gibi belirtilen kromatografi şartlarında aflatoksin B_1 11.75, aflatoksin B_2 9.31, aflatoksin G_1 7.35 ve aflatoksin G_2 5.94. dakikada pik vermiştir.

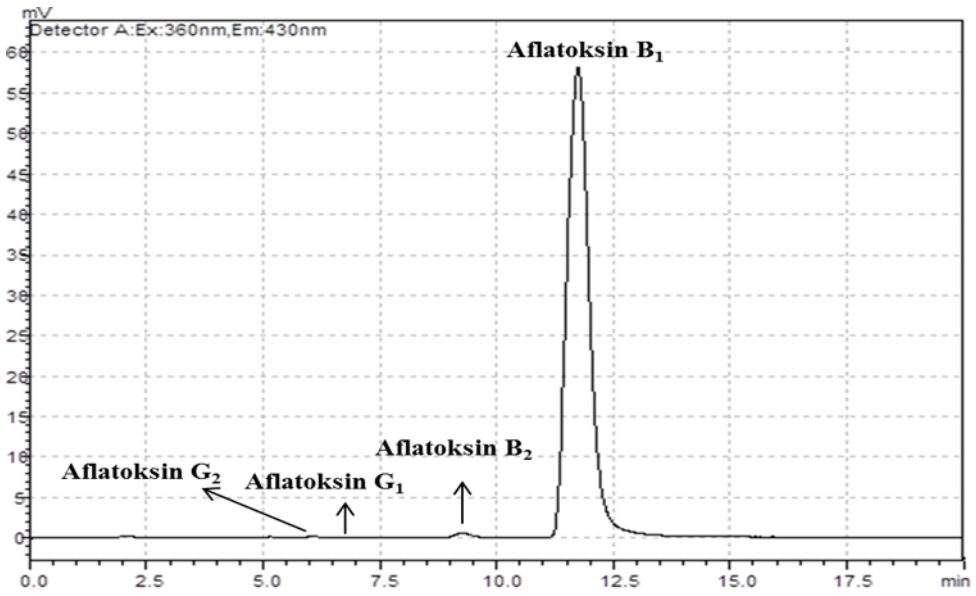


Şekil 2.6: İçerisinde 2 ppb aflatoksin B_1, 0.58 ppb aflatoksin B_2, 1.98 ppb aflatoksin G_1 ve 0.54 ppb aflatoksin G_2 bulunduran aflatoksin standart çözeltisine ait kromatogram

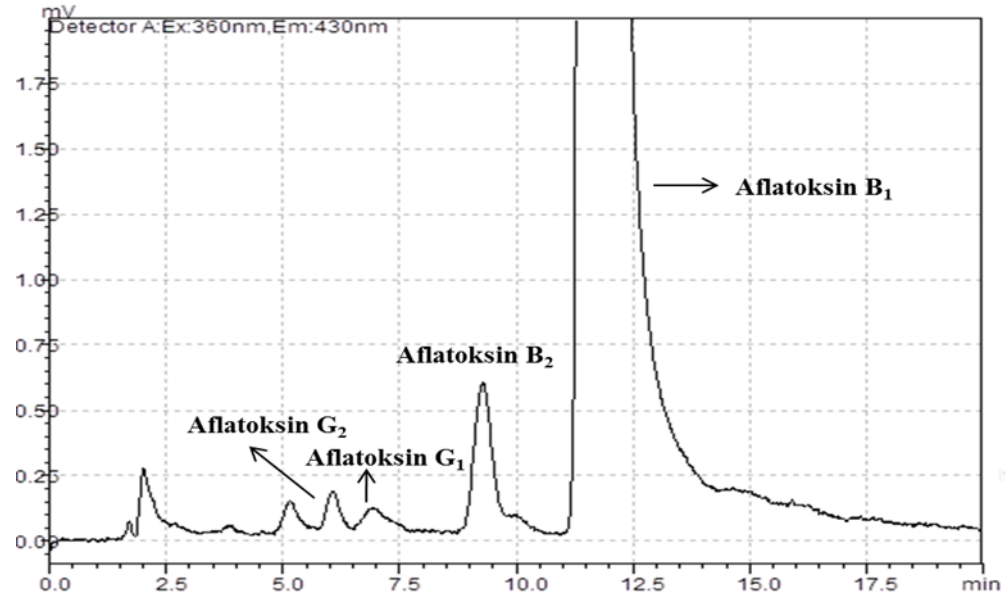
Kuru incirden hazırlanan besiyerinde yapılan aflatoksin analizi sonucu elde edilen kromatogram Şekil 2.7'de verilmiştir. Şekildeki kromatogramda görüldüğü gibi aflatoksin B_1 11.74. dakikada pik vermiştir. Aflatoksin B_2, G_1 ve G_2 ise sırasıyla 9.28, 6.90 ve 6.06. dakikalarda pik vermiştir.

Kalibrasyon eğrilerini çizmek için toplam aflatoksin standardı kullanılarak metanol ile içersinde 2-10 ppb aflatoksin B_1, 0.58-2.9 ppb aflatoksin B_2, 1.98-9.9 ppb aflatoksin G_1 ve 0.54-2.7 ppb aflatoksin G_2 bulunan çözeltiler hazırlanmış ve sırasıyla HPLC (High Pressure Liquid Chromatography=Yüksek Basınçlı Sıvı

Kromatografisi) cihazına enjekte edilmiştir. Her bir konsantrasyon için tüm aflatoksin çeşitlerinin ayrı ayrı 5 noktalı kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 2.8'de verilmiştir.

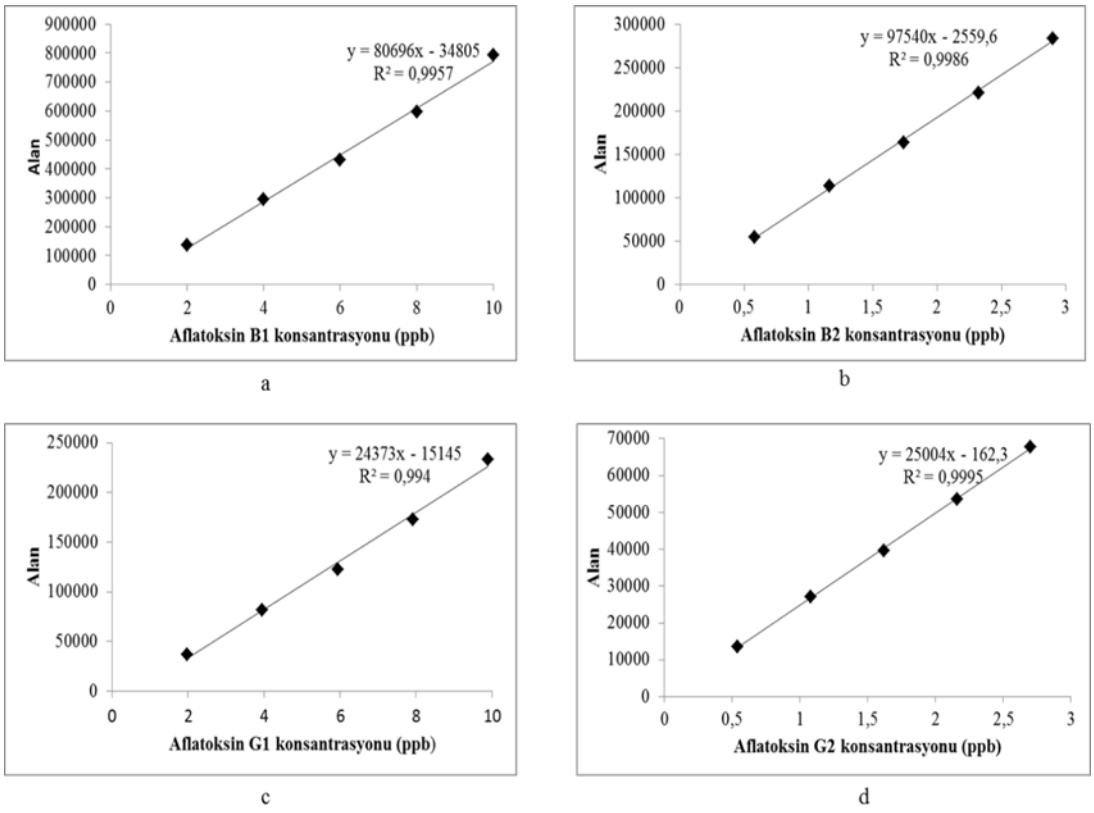


(a)



(b)

Şekil 2.7: Kuru incirden hazırlanan besiyerine ait kromatogram a) Kuru incirden hazırlanan besiyerinde aflatoksin B_1, B_2, G_1 ve G_2 pikleri, b) Kuru incirden hazırlanan besiyerinde aflatoksin B_1, B_2, G_1 ve G_2 piklerinin büyültülmüş hali.



Şekil 2.8: Aflatoksin kalibrasyon eğrileri a) Aflatoksin B_1 için çizilen kalibrasyon eğrisi, b) Aflatoksin B_2 için çizilen kalibrasyon eğrisi, c) Aflatoksin G_1 için çizilen kalibrasyon eğrisi, d) Aflatoksin G_2 için çizilen kalibrasyon eğrisi.

2.6.2 Ekstraksiyon ve Temizleme

Besiyerinde aflatoksin analizi AOAC 999.07 numaralı "Fıstık ezmesi, Antepfıstığı Ezmesi, İncir Ezmesi ve Acı Pulbiber Tozunda Aflatoksin Belirlenmesi" başlıklı resmi metod modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Stroka ve diğ. 2000). Petri kabı içerisindeki besiyerinin tamamı (yaklaşık 20 g) Waring blenderın haznesine alınmış ve içerisine 2.5 g sodyum klorür (NaCl; Sigma-Aldrich, 31434), 7.5 ml saf su ve 70 ml saf metanol (Sigma, 24229) ilave edilmiştir. Blender 1 dakika düşük devir hızıyla çalıştırılmıştır. Daha sonra blender içeriği kaba filtre kağıdından süzülmüştür. Süzüntüden 5 ml alınıp 10 ml fosfat tampon çözeltisi (phosphate buffer solution=PBS) (pH 7.4) ile seyreltilmiştir. PBS; 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4, ve 1.45 g disodyum hidrojen dihidratın ($Na_2HPO_4.2H_2O$; Merck, 106580) 1000 ml saf su içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

Seyreltilmiş besiyeri ekstraktı (15 ml) doğal akış hızında (3 ml/dakika) immuno affinite kolondan (IAC; Aflatest, Vicam Watertown, MA, U.S.A) geçirilmiştir. Filtrattan sonra kolondan birkaç defa hava geçirilmiştir. Kolon iki kez 10 ml saf su geçirilerek (5 ml/dakika) yıkanmış ve ardından tekrar birkaç defa hava geçirilmiştir. Kolonda tutulmuş aflatoksinler 1 ml HPLC saflığında metanol (Merck, 106007) ve 1 ml saf su ile elue edilmiş ve bir vialde toplanmıştır.

2.6.3 HPLC Analizleri

Besiyerinden ekstrakte edilmiş örneklerin aflatoksin analizi HPLC cihazı (Shimadzu LC-20AD, Kyoto, Japan) ve buna bağlı çalışan floresans dedektörde (Shimadzu RF-20A) gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılan çözeltiler aflatoksin B_1 ve G_1'in floresans yayınımlarını değiştirdiği için söz konusu aflatoksinlerin dedektör tarafından kolayca teşhis edilmesini sağlamak amacıyla türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. HPLC kolonu ile floresans dedektör arasına yerleştirilen bir hücrede (Coring Cell, CC3200130) elektrokimyasal olarak üretilen brom ile aflatoksin B_1 ve G_1, daha yüksek floresans özellik gösteren türevleri B_{2a} ve G_{2a}'ya dönüştürülmüştür. Türevlendirme işleminin gerçekleştirilmesi için mobil faz içerisine potasyum bromür (KBr; Sigma-Aldrich, 02110) ve nitrik asit (HNO_3; Merck, 100443, %65'lik sulu çözelti) ilave edilmiştir.

Aflatoksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC cihazının özellikleri ve analizlerdeki kromotografi koşulları Tablo 2.10'da verilmiştir. Tüm aflatoksin analizleri, her bir uygulama için 2 besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Söz konusu her bir besiyerinin ekstraktından cihaza 2 kere enjeksiyon yapılmıştır.

Tablo 2.10: Aflatoksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC cihazının özellikleri ve analizlerdeki kromotografi koşulları

HPLC	Shimadzu LC-20AD, Kyoto, Japan
Pompa	Shimadzu LC-20A
Degasser	Shimadzu DGU-20A
Kolon	ODS 2 analitik kolon (Thermo Scientific, ODS 2 Hypersil, partikül çapı: 3µm, 150*4.6 mm iç çap)
Kolon fırını	25°C (Shimadzu CTO-20A)
Dedektör	Floresans Dedektör (Shimadzu RF-20A)
Mobil faz	Metanol:Su (216 mg KBr+ 636 µl 4 M'lık HNO_3) (40:60)
Akış hızı	1 ml/dakika
Dalga boyu	Tahrik=excitation dalga boyu 360 nm, Yayım=emission dalga boyu 430 nm
Enjeksiyon hacmi	20 µl

2.6.4 Aflatoksin Analizlerinde Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırının Belirlenmesi

Aflatoksin analizlerinde gözlenebilme sınırı (LOD, Limit of Detection) ve tayin sınırı (LOQ, Limit of Quantification) değerini belirlemek için 5 noktalı kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Bunun için toplam aflatoksin standardı kullanılarak metanol ile içerisinde 0.025-0.5 ppb aflatoksin B_1, 0.00725-0.145 ppb aflatoksin B_2, 0.2475-0.495 ppb aflatoksin G_1 ve 0.00675-0.135 ppb aflatoksin G_2 bulunan çözeltiler hazırlanmış ve sırasıyla HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir konsantrasyon için 3 enjeksiyon yapılmıştır. Kalibrasyon eğrileri ve (4.2) ile (4.3) eşitliği yardımıyla her bir aflatoksin çeşidi için LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler sırasıyla aflatoksin B_1 için 0.03 ve 0.1 pbb, aflatoksin B_2 için 0.005 ve 0.01 ppb, aflatoksin G_1 için 0.02 ve 0.07 ppb ve aflatoksin G_2 için 0.01 ve 0.03 ppb olarak tespit edilmiştir.

$$LOD = \frac{3.3x Standart\ sapma}{eğim} \quad (4.2)$$

$$LOQ = \frac{10x Standart\ sapma}{eğim} \quad (4.3)$$

2.6.5 Aflatoksin Ekstraktlarında Geri Alma Denemeleri

Besiyeri örneklerinde aflatoksinin ne kadar verimli bir şekilde ekstrakte edildiğini tespit etmek için geri alma denemeleri aynı yöntem ve cihaz kullanılarak yapılmıştır. CZA besiyeri içerisine belirli miktarda (son hacimde 1 ppb aflatoksin B_1 olacak şekilde) toplam aflatoksin standart çözeltisi ilave edilmiştir. Aflatoksin standart çözeltisinin besiyeri bileşimine dahil olması için 15 dakika beklenmiştir. Daha sonra yukarıda açıklandığı gibi ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve örnek HPLC cihazına 3'er kez enjekte edilmiştir. Aflatoksin ekstraktlarında geri alma denemeleri 2 paralelli yapılmıştır. İşlem sonunda tüm verilerin ortalaması alınmış ve her bir aflatoksin çeşidi için geri alma oranı yüzde olarak hesaplanmıştır. Bu oran aflatoksin B_1 için %87, aflatoksin B_2 için %60, aflatoksin G_1 için %120 ve aflatoksin G_2 için %55 olarak bulunmuştur. Besiyeri örneklerinin HPLC'de okutulmasıyla elde edilen veriler geri kazanım oranı verileri dikkate alınarak hesaplanmıştır.

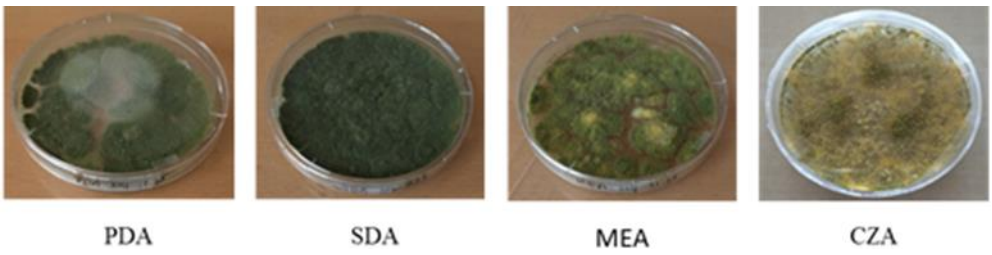
2.7 İstatistik Analiz

Çalışmamızda istatistik değerlendirmeler "Minitab 16 Statistical Software" programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) tekniği ile değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey testi ile karşılaştırılmış ve karşılaştırma gruplarına ait veriler $\alpha = 0.05$ güven aralığına göre test edilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

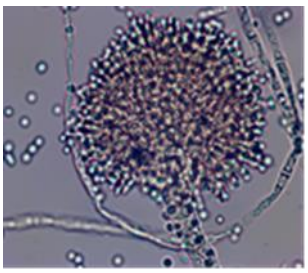
3.1 *A. flavus* Suşunun Teşhisi

A. flavus küf izolatının PDA, SDA, MEA ve CZA besiyerleri üzerinde gösterdiği koloni rengi Hamed ve diğ. (2016)'nin önerdiği yöntem kullanılarak teşhis edilmiştir. 30°C'de 7 gün inkübe edilen *A. flavus*, PDA ve SDA besiyerlerinde koyu yeşil renkte koloni rengi verirken MEA besiyerinde yeşil, CZA besiyerinde ise sarımsı yeşil renkte koloni rengi vermiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.9: Farklı besiyerlerinde gelişimi gözlenen *A. flavus* küfünün koloni rengi

Çalışmamızda *A. flavus*'un mikroskobik yapısı incelenmiştir. PDA besiyeri üzerinde gelişen küf kolonisinden hazırlanan preparatın ışık mikroskobundaki görüntüsü Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10: PDA besiyeri üzerinde gelişen *A. flavus* kolonisinden hazırlanan preparatın ışık mikroskobundaki görüntüsü (Büyütme: 40X objektif ile görüntülenmiş)

3.2 Mineral Maddelerin *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi

Çalışmamızda, incelenecek mineral maddeleri ayrı ayrı birer bileşen olarak yapısında bulunduran CZA besiyeri kullanılmıştır. CZA besiyeri bileşiminde bulunan $NaNO_3$, $MgSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$, KCl ve KH_2PO_4 mineral bileşiklerinin besiyeri ortamından çıkarılmasıyla modifiye besiyerleri hazırlanmıştır. Besiyerlerinde pH-metre ile potansiyometrik olarak saptanan pH sonuçları Tablo 3.11'de verilmiştir. Hazır olarak temin edilen CZA besiyeri için pH değeri 7.20 olarak saptanırken, tarafımızdan her bir bileşenin ilavesiyle hazırlanan besiyeri için bu değer 4.97 olarak saptanmıştır. Aradaki fark, hazır olarak temin edilen besiyerinin üretiminde bir pH ayarlaması yapılmış olabileceğini düşündürmektedir. Genelde küflerin geniş bir pH aralığında gelişim gösterdiği bilindiğinden (Özer 2009, Turhan 2010), çalışmamızda besiyeri hazırlama aşamasında herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır. CZA besiyerinden bazı bileşenlerin çıkarılmasıyla hazırlanan modifiye besiyerlerinde ise pH değeri 5.05-5.73 arası değişim göstermiştir.

Tablo 3.11: Modifiye besiyerlerinde pH ölçüm sonuçları

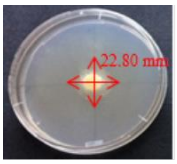
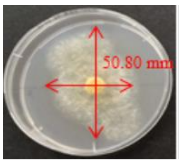
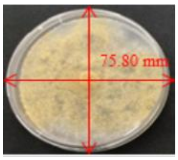
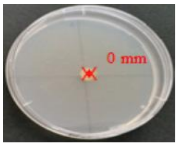
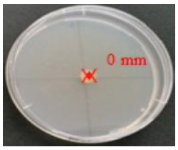
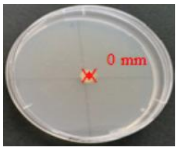
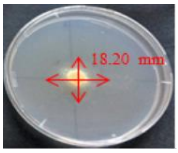
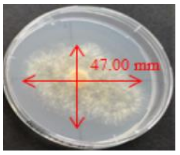
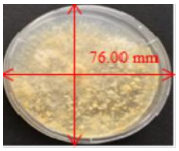
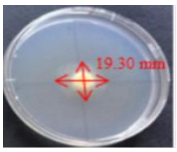
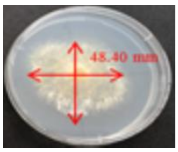
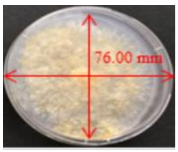
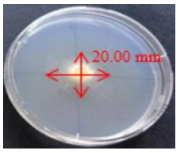
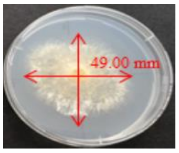
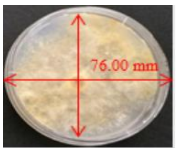
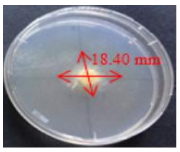
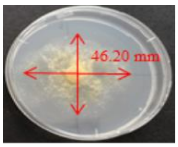
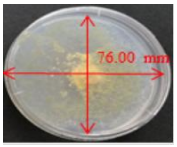
Besiyeri	**pH**
Hazır temin edilen CZA besiyeri	7.20
Tarafımızdan hazırlanan CZA besiyeri (kontrol)	4.97
$NaNO_3$ içermeyen CZA besiyeri	5.05
$MgSO_4$ içermeyen CZA besiyeri	5.24
$Fe_2(SO_4)_3$ içermeyen CZA besiyeri	5.26
KCl içermeyen CZA besiyeri	5.08
KH_2PO_4 içermeyen CZA besiyeri	5.73

Besiyerinden çıkarılan mineral maddelerin küf gelişimi üzerine etkisini belirlemek için inkübasyonun 2, 4 ve 6. günü *A. flavus* izolatının koloni çapı petri kutusunun arka yüzeyine çizilen 2 dik düzlemde ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.12'de verilmiştir. Tabloda görüldüğü üzere, kontrol grubunda inkübasyonun 2, 4 ve 6. günü sırasıyla 22.80 mm, 50.88 mm ve 75.80 mm küf koloni çapı ölçülmüştür. $NaNO_3$ içermeyen CZA besiyerinde inkübasyon süresi boyunca küf gelişimi gözlenmemiştir. Diğer besiyerlerinde küf koloni çapı 2. gün 18.20-20.00 mm, 4. gün 46.20-49.00 mm ve 6. gün 76.00 mm olarak ölçülmüştür. İnkübasyonun

2, 4 ve 6. günü $NaNO_3$ içermeyen CZA besiyeri dışındaki diğer modifiye besiyerlerinde ölçülen küf koloni çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Kontrol grubu besiyerinde olduğu gibi diğer besiyerlerinde de benzer düzeyde küf gelişimi gözlenmiştir.

Çalışmamızda Mg, Fe ve K mineral maddelerinin besiyerinde bulunan dozlarda küf gelişimini olumlu ya da olumsuz etkilemediği sonucuna varılmıştır. Aflatoksin üreticisi küflerden *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un besiyerindeki gelişiminin, ortamda belirli miktarda bulunan Na (Uraih ve Chipley 1976), Mg (Davis ve diğ. 1967), Fe (Aziz ve Moussa 1997) ve K (Zohri ve diğ. 1997) minerallerinin varlığıyla önemli düzeyde arttığı geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Esasen, ortamdaki mineral maddelerin ve/veya tuzlarının, belirli bir konsantrasyonun üzerinde küf gelişimini engelleyici yönde etki gösterdiği bilinmektedir (Holmquist ve diğ. 1983, Shahin ve Aziz 1997, Stiles ve diğ. 2002). Ancak, genellikle düşük dozlardaki (meyve-sebzelerde doğal halde bulunduğu oranlarda) mineral maddelerin *Aspergillus* (Abu-Mejdad 2013), *Penicillium* (Stone ve Farrell 1946) ve *Fusarium* (Jackson ve diğ. 1989) gibi önemli mikotoksin üreticisi küf türlerinin gelişimini teşvik ettiği ortaya konmuştur. Çalışmamızda elde edilen bir başka sonuç da $NaNO_3$ bileşeninin çıkarıldığı besiyerinde 6 günlük inkübasyon süresi boyunca küfün gelişmediğidir.

Tablo 3.12: Mineral maddelerin yokluğunun küf gelişimi üzerine etkisi*

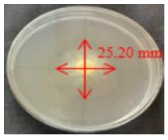
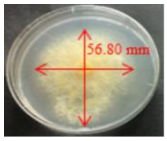
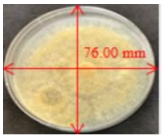
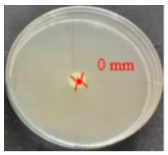
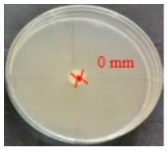
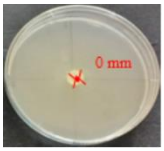
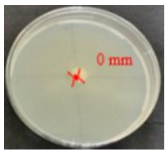
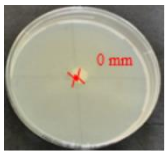
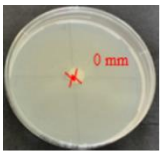
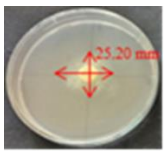
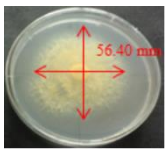
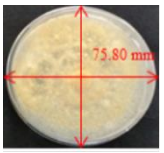
Besiyeri	2. gün	4. gün	6.gün
Kontrol			
$NaNO_3$ içermeyen CZA			
$MgSO_4$ içermeyen CZA			
$Fe_2(SO_4)_3$ içermeyen CZA			
KCl içermeyen CZA			
KH_2PO_4 içermeyen CZA			

*: Küf koloni çapı sonuçları mm olarak verilmiştir.

3.3 *A. flavus* Gelişimi Üzerine Sodyum ve Nitratın Etkisi

Çalışmamızda CZA besiyerinden $NaNO_3$ bileşeni çıkarıldığında küf gelişememiştir. Bunun nedeninin $NaNO_3$ bileşiğindeki Na fraksiyonundan mı yoksa NO_3 fraksiyonundan mı kaynaklandığı bilinmemektedir. Bunu ortaya koymak amacıyla, CZA besiyeri bileşiminden $NaNO_3$ çıkartılmış, yerine Na kaynağı olarak Na_2SO_4 ve NO_3 kaynağı olarak KNO_3 içeren besiyerleri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Söz konusu besiyerlerinde inkübasyonun 2, 4 ve 6. günü küf koloni çapı ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.13'te verilmiştir.

Tablo 3.13: Küf gelişimi üzerine sodyum ve nitratın etkisi*

Besiyeri	2. gün	4. gün	6.gün
$NaNO_3$ içeren CZA			
$NaNO_3$ içermeyen CZA			
$NaNO_3$ yerine Na_2SO_4 içeren CZA			
$NaNO_3$ yerine KNO_3 içeren CZA			

*: Küf koloni çapı sonuçları mm olarak verilmiştir.

Tablodan da açıkça görüldüğü gibi, içerisinde nitrat bulunan besiyerlerinde küf gelişimi gözlenirken içerisinde nitrat bulunmayan besiyerlerinde küf gelişimi gözlenmemiştir ($p<0.05$). İçerisinde nitrat bulunan besiyerlerinde küf koloni çapı 2.gün 25.20 mm, 4.gün 56.40-56.80 mm ve 6.gün 75.80-76.00 mm olarak ölçülmüştür.

Gerçekleştirilen bu deneyle, *A. flavus*'un gelişmek için besiyeri ortamında bulunan $NaNO_3$ bileşenini sodyum kaynağı olarak değil de azot kaynağı olarak kullandığı ortaya konmuştur. Literatürde, *A. flavus* küfünün gelişmesi ve aflatoksin üretmesi için ortamda azot kaynağı olarak aminoasitleri, nitrat, nitrit, üre, amonyak, amonyum nitrat, amonyum sülfat gibi azotlu bileşikleri kullandığına dair çalışmalar mevcuttur (Payne ve Hagler 1983, Ehrlich ve diğ. 2007, Kranthi ve diğ. 2012). Mehl ve Cotty (2013) CZA besiyerinde karbon kaynağı olarak bulunan sukroz (8.8-88 mM) ve azot kaynağı olarak bulunan $NaNO_3$ (3.5-35 mM) miktarını modifiye etmişlerdir. Hazırladıkları besiyerlerinde 6 farklı *A. flavus* suşunun gelişimini izlemişlerdir. Araştırmacılar küf gelişiminin suşa, besiyerindeki sukroz ve $NaNO_3$ miktarına göre farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Besiyerindeki sukroz ve $NaNO_3$ miktarına bağlı olarak bazı suşlarda gelişim artar veya azalırken bazılarında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. McAlpin ve Wicklow (2005) CZA besiyerinde

Aspergillus section *flavi* üyesine ait küf türlerinin gelişimini takip etmişlerdir. Mevcut besiyerine $NaNO_3$ yerine amonyum tartarat, glutamik asit ve serin gibi azot kaynaklarının ilave edilmesinin küf gelişimini artırdığını ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada, Wang ve diğ. (2017) CZA besiyerinde *A. flavus* gelişimi ve aflatoksin oluşumu için glutamin aminoasitinin iyi bir azot kaynağı olduğunu bildirmişlerdir.

3.4 Farklı Besiyerlerinde *A. flavus* Gelişimi

CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerlerinde *A. flavus* gelişimi takip edilmiştir. İnkübasyonun 2, 4 ve 6. günü söz konusu besiyerlerinde küf koloni çapı ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.14'te verilmiştir.

Tablo 3.14: Farklı besiyerlerinde küf koloni çapı ölçüm sonuçları (mm)*

Besiyeri	2.gün	4.gün	6.gün
CZA	16.80±1.48 c	43.40±0.89 b	74.00±1.46 b
PDA	21.40±1.82 b	50.00±8.46 b	74.80±1.30 ab
Kuru incirden hazırlanan agar	32.20±1.10 a	74.90±1.24 a	76.00±0.00 a

*: Aynı örnekleme günü için farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

İnkübasyonun 2. günü dikkate alındığında *A. flavus* en yavaş CZA besiyerinde, sonra PDA besiyerinde gelişim göstermiştir. İnkübasyonun devamında, küf gelişimi açısından CZA ve PDA besiyerleri arasındaki istatistiksel fark ortadan kalkmıştır ($p>0.05$). Kuru incirden hazırlanan besiyerinde ise küf gelişimi diğer iki besiyerine göre daha hızlı gerçekleşmiştir ($p<0.05$). İnkübasyonun son günü PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerleri arasında küf gelişimi açısından istatistiksel olarak fark bulunmamasına rağmen ($p>0.05$), küf kolonisi kuru incirden hazırlanan besiyerinde PDA besiyerine göre daha hızlı gelişim göstermiştir. Çalışmamızdan elde edilen bu sonuçlar, küf gelişimi için kuru incirden hazırlanan besiyerinin diğer iki besiyerine göre daha iyi bir ortam olduğunu göstermektedir. İncir meyvesinin yüksek şeker ve zengin vitamin, mineral madde içeriğiyle küf gelişimi için iyi bir substrat olduğu bilinmektedir (Morton ve diğ. 1979). Birçok küf türünün yerfıstığı içeren besiyerinde patates içeren besiyerine göre daha iyi gelişim gösterdiği ve bu

durumun yerfıstığının mineral madde içeriğinin patatese göre daha yüksek olmasından kaynaklandığı ifade edilmiştir (Ikechi-Nwogu ve Elenwo 2012).

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar göstermiştir ki, *A. flavus* besiyeri bileşimine bağlı olarak farklı besiyerlerinde farklı düzeyde gelişim göstermektedir. Bu durumun, besiyeri bileşimindeki farklılıklardan meydana geldiği düşünülmektedir. Cotty (1994) topraktan *A. flavus* grubu küf türlerini izole etmek için CZA, *Aspergillus flavus* ve *parasiticus* agar, Rose bengal agar ve modifiye Rose bengal agar besiyerlerini kullanmıştır. Bu küf türlerinin popülasyon biyolojisi üzerine çalışma yapmak için en kullanışlı besiyerinin modifiye Rose bengal agar besiyeri olduğunu tespit etmiştir. Yazar, bu durumu modifiye Rose bengal agar besiyerinin bileşimindeki maddelerle (sukroz, nitrat vb.) ilişkilendirmiştir.

3.5 Farklı Besiyerlerine Şelat Ajanı İlavesinin *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

3.5.1 CZA Besiyerine İlave Edilen Şelat Ajanlarının *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi

3.5.1.1 Sitrik Asit

CZA besiyerine 0.175, 0.875 ve 1.75 mM sitrik asit ilavesinin küf gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. İnkübasyonun 2, 4 ve 6. günü elde edilen sonuçlar Tablo 3.15'te verilmiştir.

Tablo 3.15: CZA besiyerinde sitrik asitin küf gelişimi üzerine etkisi*

Konsantrasyon	% İnhibisyon		
	2.gün	4.gün	6.gün
Kontrol	0±0 a	0±0 a	0±0 a
0.175 mM	1.96±3.30 a	0.09±0.20 a	0.80±0.18 a
0.875 mM	0.43±0.97 a	0±0 a	0±0 a
1.75 mM	0±0 a	0±0 a	0±0 a

*: Aynı örnekleme günü için aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Çalışmamız sonucunda besiyeri ortamına şelat ajanı olarak katkılanan sitrik asitin denenen dozlarda küf gelişimi önlemede etkili olmadığı sonucuna varılmıştır. İnkübasyonun 2, 4 ve 6. günü; sitrik asit katkılı besiyerleri, kontrol grubu ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). İnkübasyonun 2. gününde; 0.175 ve 0.875 mM düzeyinde sitrik asit katkılanan besiyerlerinde sınırlı bir inhibisyon etki (%1.96 ve 0.43) tespit edilse de bu etki, inkübasyon süresinin devamında ya azalmış ya da tamamen ortadan kalkmıştır. Schultz ve diğ. (1999) yemlerde sitrik asit, propiyonik asit, laktik asit ve formik asitin *A. fumigatus, P. verrucosum, R. arrhizus, C. albicans* vb. maya ve küf türleri üzerine fungistatik etkisini incelemişlerdir. Çalışmada denenen organik asitlerden yalnızca formik asitin (%1-2) söz konusu mikroorganizmaların gelişimini sınırlandırdığı gözlenmiş, sitrik asitin ise incelenen maya ve küf türlerinin gelişimlerini önlemede etkili olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların tez çalışmamızın bulgularıyla uyumlu olduğu görülmektedir.

3.5.1.2 Fitik Asit

CZA besiyerine 0.175, 0.438 ve 0.875 mM fitik asit ilavesinin küf gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. İnkübasyonun 2, 4 ve 6. günü elde edilen sonuçlar Tablo 3.16'da gösterilmiştir.

Tablo 3.16: CZA besiyerinde fitik asitin küf gelişimi üzerine etkisi*

Konsantrasyon	**% İnhibisyon**		
	2.gün	**4.gün**	**6.gün**
Kontrol	0±0 a	0±0 a	0±0 a
0.175 mM	2.35±3.22 a	0.62±1.38 a	0.16±0.22 a
0.438 mM	0±0 a	0±0 a	0±0 a
0.875 mM	0±0 a	0±0 a	0±0 a

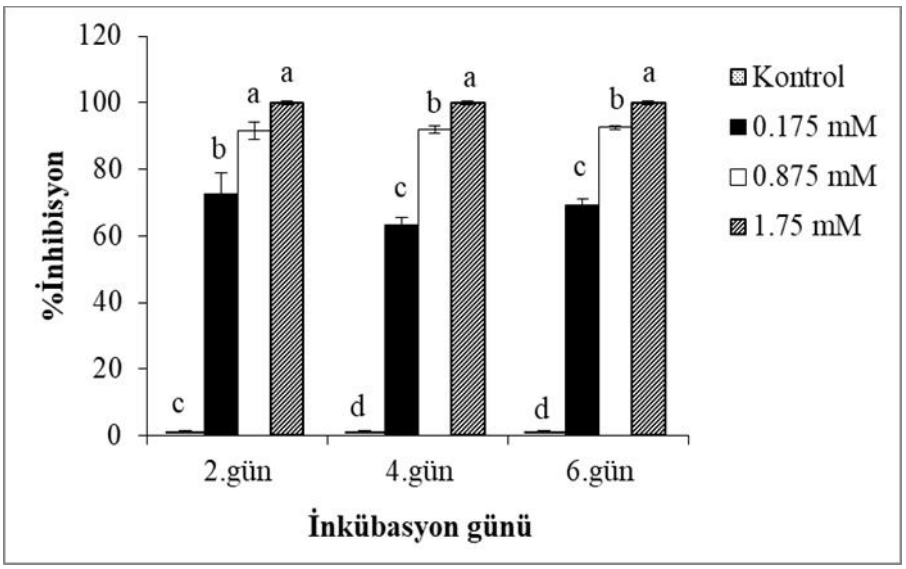
*: Aynı örnekleme günü için aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Deneyler sonucunda, CZA besiyerine şelat ajanı olarak belirli dozlarda katkılanan fitik asitin küf gelişimini önlemede etkili olmadığı tespit edilmiştir. İnkübasyonun 2, 4 ve 6. günü; fitik asit katkılı besiyerleri, kontrol grubu ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). İnkübasyonun 2. günü 0.175 mM fitik asit katkılı besiyerinde %2.35

düzeyinde inhibisyon etki gözlenirken inkübasyon süresi uzadıkça bu etki giderek azalmış ve inkübasyonun 6. günü neredeyse tamamen ortadan kaybolmuştur. Dayi ve diğ. (1995) düşük dozlarda (0.01-0.24 mg/100 ml) CZA besiyerine katkılanan fitik asitin *A. flavus* gelişimini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Yazarlar, fitik asitin bu etkisini; gelişme evresindeki küfün solunum aktivitesini azaltmasına atfetmişlerdir.

3.5.1.3 EDTA

CZA besiyerine 0.175, 0.875 ve 1.75 mM EDTA ilavesinin küf gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11: CZA besiyerinde EDTA'nın küf gelişimini inhibe etme yüzdesi*
*: Aynı örnekleme günü için farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

CZA besiyerinde elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda küf gelişimini önlemede etkili bulunan tek şelat ajanı EDTA olmuştur. Bu ajanın 0.175 ve 0.875 mM'lık konsantrasyonları küf gelişimini sırasıyla %63.36-72.47 ve %91.67-92.57 oranında inhibe ederken 1.75 mM EDTA küf gelişimi tamamen inhibe etmiştir. Besiyeri ortamına katkılanan EDTA'nın konsantrasyonu arttıkça küf gelişimini önlemedeki etkisi artmıştır. Sonuçlar istatistik açıdan değerlendirildiğinde, inkübasyonun 2. günü 0.875 ve 1.75 mM EDTA benzer inhibisyon etki göstermiştir ($p>0.05$). Ancak; inkübasyonun 4 ve 6. günü 1.75 mM EDTA, 0.875 mM EDTA'ya göre daha fazla inhibisyon etki göstermiştir ($p<0.05$). Abrunhosa ve Venancio (2008)

Czapek maya ekstrakt agar (CYA) besiyerinde 0.1-10 mM Na_2-EDTA'nın *A. carbonarius, A. ibericus,* toksijenik ve toksijenik olmayan *A. niger* üzerine antifungal etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, 0.1 mM Na_2-EDTA'nın *A. carbonarius, A. ibericus,* toksijenik ve toksijenik olmayan *A. niger* gelişimini sırasıyla %32, 56, 36 ve 16 oranında inhibe ettiğini, 10 mM Na_2-EDTA'nın ise söz konusu küf türleri üzerine sırasıyla %88, 89, 87 ve 82 oranında inhibisyon etki gösterdiğini bulmuşlardır. Çalışmamızda olduğu gibi bu çalışmada da araştırmacılar, Na_2-EDTA'nın besiyeri ortamında konsantrasyonunun arttıkça inhibisyon etkisinin arttığını tespit etmişlerdir. Na_2-EDTA'nın bu etkisi, ortamda bulunan farklı metalleri bağlayarak canlının hücre duvarının bütünlüğünü bozmasına dayandırılmıştır.

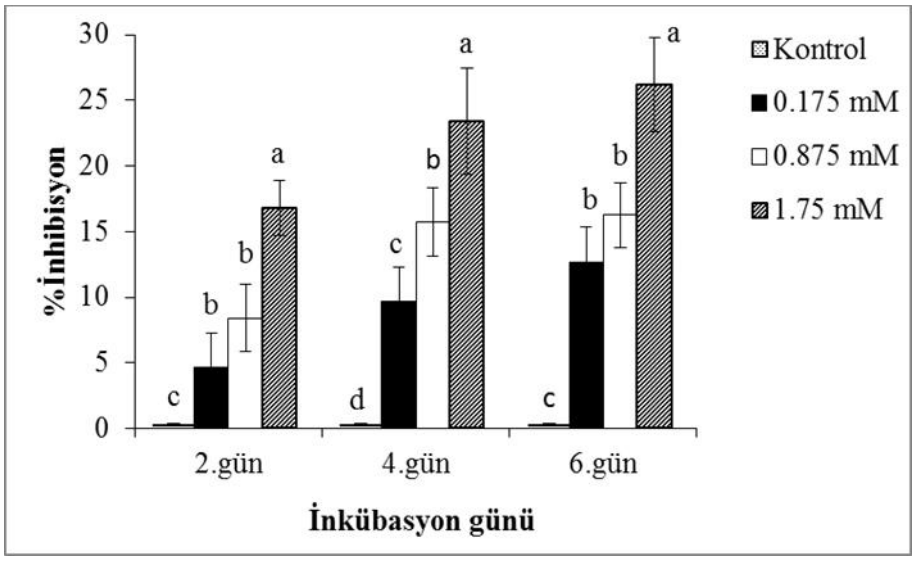
Çalışmamızın "3.2 Mineral Maddelerin *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi" başlıklı bölümünde CZA besiyerinden $NaNO_3$ bileşeninin çıkarılması durumunda *A. flavus* küfünün gelişmediği tespit edilmiştir. Bunun muhtemel nedeni, $NaNO_3$'ın besiyerinde bulunan tek azot kaynağı olduğu ve küfün gelişimi için bu kaynağa kesinlikle ihtiyaç duyduğu gerçeğidir. Besiyerine katkılanan EDTA şelat ajanı, küf gelişimi üzerine önemli düzeyde inhibisyon etki göstermiştir. EDTA'nın 1.75 mM'lık konsantrasyonu küf gelişimini tamamen önlemiştir. Bu durumda akla ilk gelen; EDTA ile nitrat arasında bir şelatlama işleminin gerçekleştiği ve EDTA'nın nitratı bağlayarak küfün gelişimi için gerekli olan besiyerindeki tek azot kaynağını besiyeri ortamından uzaklaştırmış olabileceğidir. Bir başka muhtemel mekanizma ise, EDTA'nın denitrifikasyon prosesinde rol alarak nitratı antimikrobiyal özelliğe sahip bileşiklere indirgemesi ve bu bileşiklerin küf gelişimini engelleyici yönde etki göstermesidir. Denitrifikasyon; anaerobik koşullarda nitratın parçalanarak nitrit, nitrik oksit ve moleküler azota dönüşmesi işlemine verilen isimdir (Firestone ve Davidson 1989). Fe(II)EDTA'nın nitrik oksiti moleküler azota indirgeyerek denitrifikasyon prosesinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Maas ve diğ. 2003). Denitrifikasyon prosesinin ürünlerinden biri olan nitrik oksitin *in vitro* koşullarda *A. niger, P. italicum ve Monilinia fructicola* gibi küflerin gelişimini önlediği Lazar ve diğ. (2008) tarafından yapılan çalışmayla ortaya konmuştur. Nitrik oksit gibi denitrifikasyon sırasında oluşabilecek bir diğer bileşik de nitrittir. Nitritin birçok bakteri (*E. coli, B. subtilis* vb.), küf (*A. flavus, P. italicum, F. oxysporum* vb.) ve maya (*C. albicans* vb.) gibi çeşitli mikroorganizma türlerine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir (Stanojevic ve diğ. 2009). Literatürden elde edilen bu

bulgular; EDTA'nın besiyeri ortamındaki nitratı nitrik oksit ve nitrit gibi antimikrobiyal özelliğe sahip maddelere indirgemiş olabileceğini ve söz konusu maddelerin *A. flavus* gelişimini inhibe etmiş olabileceğini düşündürmektedir.

3.5.2 PDA Besiyerine İlave Edilen Şelat Ajanlarının *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi

3.5.2.1 Sitrik Asit

PDA besiyerine 0.175, 0.875 ve 1.75 mM sitrik asit ilavesinin küf gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.12'de verilmiştir.



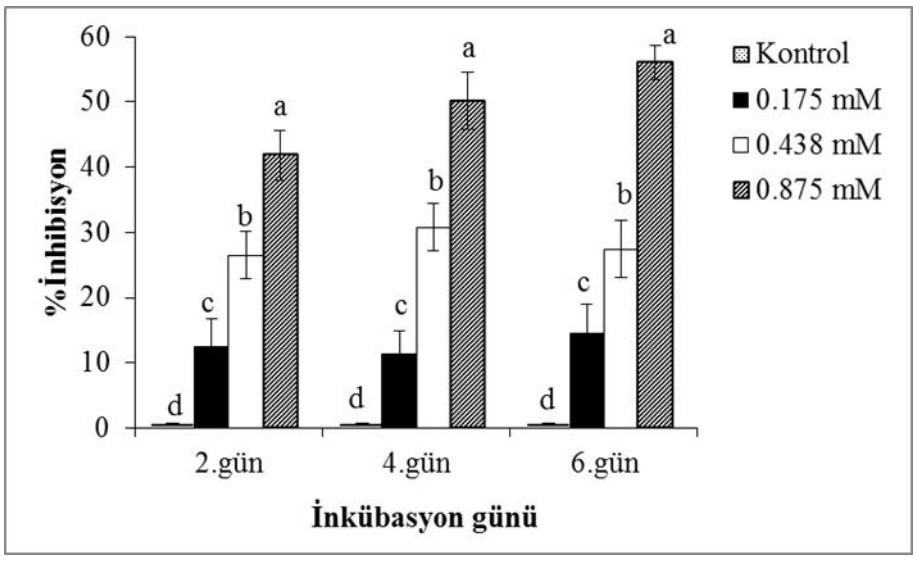
Şekil 3.12: PDA besiyerinde sitrik asitin küf gelişimini inhibe etme yüzdesi
*: Aynı örnekleme günü için farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

Şekil 3.12'de görüldüğü gibi denenen sitrik asit dozları PDA besiyerinde küf gelişimini önlemede etkili olmuştur. İnkübasyon süresi uzadıkça denenen her bir doz için sitrik asitin %inhibisyon değerinde artış gözlenmiştir. Sitrik asitin 0.175 mM'lık konsantrasyonu küf gelişimini %4.67-12.67, 0.875 mM'lık konsantrasyonu %8.41-16.25 ve 1.75 mM'lık konsantrasyonu %16.82-26.17 oranında inhibe etmiştir. Her örnekleme gününde sitrik asitin konsantrasyonu arttıkça inhibisyon etkisinin arttığı tespit edilmiştir. Ancak, inkübasyonun 2 ve 6. günü sitrik asitin 0.175 ve 0.875 mM'lık konsantrasyonlarının yarattığı inhibisyon değerleri arasındaki fark

istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). İnkübasyon süresi boyunca küf gelişimini önlemede en etkili dozun bu çalışmada denenen en yüksek doz olan 1.75 mM olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Gowda ve diğ. (2004) PDA besiyerinde sitrik asit, üre ve sodyum propiyonatın *A. parasiticus* gelişimini %36-64 oranında inhibe ettiğini bulmuşlardır. Benzer bir çalışmada Askarne ve diğ. (2011), 0.02 M ve 0.2 M sitrik asitin *P. italicum* gelişimini sırasıyla %29.16 ve 55.18 oranında inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Zhou ve diğ. (2007) *in vitro* koşullarda %0.2 konsantrasyondaki sitrik asitin *Salmonella typhimurium* (CGMCC 1.1174) gelişimi önemli düzeyde inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, sitrik asitin etki mekanizmasını hücrelerin sitoplazma içi pH dengesini bozarak canlının hayati metabolik reaksiyonlarını gerçekleştirmesini önlemek vb. etmenlere dayandırmışlardır. Ayrıca sitrik asitin Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarını bağlayarak hücre membran yapısını bozmuş olabileceğini de vurgulamışlardır.

3.5.2.2 Fitik Asit

PDA besiyerine 0.175, 0.438 ve 0.875 mM ilave edilen fitik asitin küf gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.13'te verilmiştir.



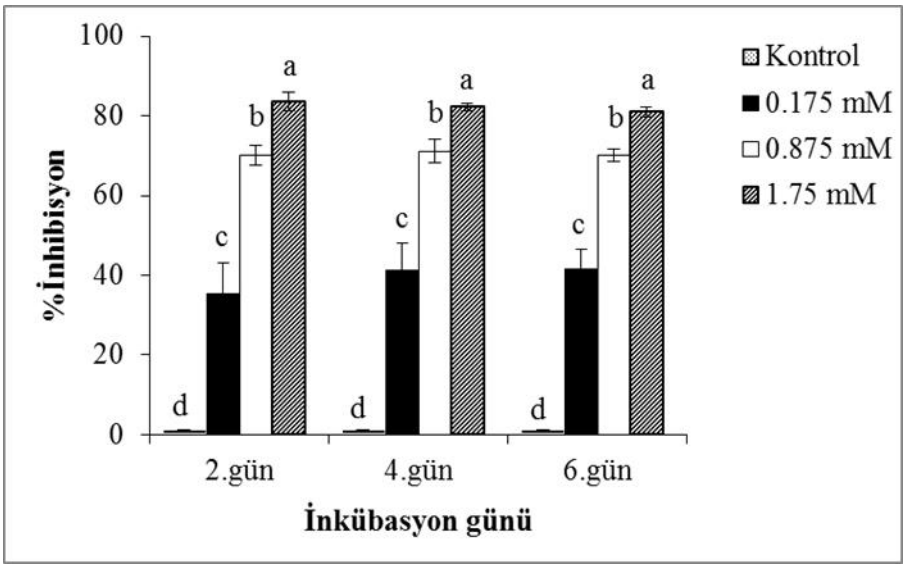
Şekil 3.13: PDA besiyerinde fitik asitin küf gelişimini inhibe etme yüzdesi
*: Aynı örnekleme günü için farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

Şekil 3.13'te görüldüğü gibi, denenen fitik asit dozları PDA besiyerinde küf gelişimini önlemede etkili bulunmuştur. Fitik asitin 0.175 mM'lık konsantrasyonu küf gelişimini %11.34-14.57, 0.438 mM'lık konsantrasyonu %26.50-30.77 ve 0.875 mM'lık konsantrasyonu %41.88-56.00 oranında inhibe etmiştir. Fitik asitin besiyerine katkılanan dozları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Fitik asitin konsantrasyonu arttıkça inhibisyon etkisi tüm örneklerde artış göstermiştir. Denenen dozlar arasında küf gelişimini önlemede en etkili fitik asit dozu bu çalışmada denenen en yüksek doz olan 0.875 mM olarak tespit edilmiştir. İnkübasyonun 6. günü 0.875 mM fitik asit %50'den fazla inhibisyon etki göstermiştir.

Zhang ve diğ. (2013) PDA besiyerinde yaptıkları çalışmalarında 4 mol/ml ve 6 mol/ml fitik asitin *B. cinerea* gelişimini önemli düzeyde inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. *In vitro* koşullarda yapılan diğer bir çalışmada %0.1-10 konsantrasyondaki fitik asitin *Pichia caribba* mayasının gelişimini artırdığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar, *P. caribba* ve %0.2-10 konsantrasyondaki fitik asitin birlikte kullanımının *P. expansum* gelişimini önlemede etkili olduğunu bulmuşlardır. *In vivo* çalışmalarda ise *P. caribba* ve %0.2 fitik asitin elmanın küflenmesini önemli düzeyde önlediği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, *P. caribba* ve fitik asit ile elde ettikleri karışımın içindeki fitik asitin yavaşça degrade olmasının, karışımın stabilitesini ve etkinliğini artırdığını ifade etmişlerdir (Mahunu ve diğ. 2016).

3.5.2.3 EDTA

PDA besiyerine 0.175, 0.875 ve 1.75 mM EDTA ilavesinin küf gelişimi üzerine etkisi ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.14'te gösterilmiştir.



Şekil 3.14: PDA besiyerinde EDTA'nın küf gelişimini inhibe etme yüzdesi
*: Aynı örnekleme günü için farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

Şekil 3.14'te görüldüğü gibi, PDA besiyerinde denenen EDTA dozları küf gelişimini önlemede etkili bulunmuştur. EDTA'nın 0.175 mM'lık konsantrasyonu küf gelişimini %35.52-41.71, 0.875 mM'lık konsantrasyonu %70.09-71.20 ve 1.75 mM'lık konsantrasyonu %81.02-83.64 oranında inhibe etmiştir. EDTA'nın besiyerine katkılanan dozları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Besiyerine EDTA şelat ajanının katkılanmasıyla küf gelişiminde önemli düzeyde bir azalma gözlenmiştir. Küf gelişimini önlemede en etkili EDTA dozununun, bu çalışmada denenen en yüksek doz olan 1.75 mM olduğu tespit edilmiştir. De Lucca (2006) Potato dextrose broth besiyerinde EDTA'nın (0-1600 µg/ml) *A. flavus, A. fumigatus, A. niger, F. moniliforme* ve *F. solani* gelişimini önemli düzeyde inhibe ettiğini bulmuştur. Askarne ve diğ. (2013) PDA besiyerinde 20 mM sodyum EDTA'nın *P. italicum*'un gelişimini tamamen önlediğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada 200 mM sodyum EDTA'nın portakalda küf gelişimini %55.22 oranında önlediği bulunmuştur. Araştırmacılar EDTA'nın sodyum tuzunun küf gelişimi üzerine etkisini glikolitik yolda (glikoliz'de) görev alan enzimlerin fonksiyonunu değiştirdiğine atfetmişlerdir.

3.5.3 Kuru İncirden Hazırlanan Besiyerine İlave Edilen Şelat Ajanlarının *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi

A. flavus, kuru incirden hazırlanan besiyerinin kontrol grubunda inkübasyon süresi boyunca çok hızlı bir şekilde gelişim gösterdiği için şimdiye kadarki deneylerde 6 günlük periyotta gelişimini tamamlayan küf, bu besiyerinde 4 günlük periyotta gelişimini tamamlanmıştır. Bu nedenle, çalışmamızda kuru incirden hazırlanan besiyerine katkılanan sitrik asit, fitik asit ve EDTA şelat ajanlarının küf gelişimi üzerine etkisini incelemek için örnekleme günü olarak inkübasyonun 2 ve 4. günü seçilmiştir.

3.5.3.1 Sitrik asit

Kuru incirden hazırlanan besiyerine 0.175, 0.875 ve 1.75 mM sitrik asit ilavesinin küf gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. İnkübasyonun 2 ve 4. günü elde edilen sonuçlar Tablo 3.17'de gösterilmiştir.

Tablo 3.17: Kuru incirden hazırlanan besiyerinde sitrik asitin küf gelişimi üzerine etkisi*

Konsantrasyon	%İnhibisyon	
	2.gün	4.gün
Kontrol	0±0 b	0±0 a
0.175 mM	2.65±1.18 ab	0±0 a
0.875 mM	4.76±2.64 a	0.13±0.29 a
1.75 mM	0.42±0.95 b	0±0 a

*: Aynı örnekleme günü için farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

Tablo 3.17'de görüldüğü gibi, inkübasyonun 2. gününde küf gelişimi 0.175 mM sitrik asit ile %2.65, 0.875 mM sitrik asit ile %4.76 oranında inhibe edilirken 1.75 mM sitrik asit ile neredeyse hiç inhibe edilememiştir. İstatistiksel açıdan 2. gün sonuçları değerlendirildiğinde yalnızca 0.875 mM sitrik asit küf gelişimini inhibe etmede kontrol ve 1.75 mM sitrik asitten farklı bulunmuştur ($p<0.05$). İnkübasyonun 2. günü gözlenen bu etki 4. gün ortadan kalkmış ve sitrik asitin denenen dozları kuru incirden hazırlanan besiyerinde küf gelişimini önlemede etkili bulunmamıştır ($p>0.05$). Basaran (2011) *in vitro* koşullarda %4 sitrik asitin *A. parasiticus* gelişimini önlemede düşük inhibisyon etki gösterdiğini tespit etmiştir. Wu ve diğ. (2011) *in*

vitro koşullarda yaptıkları deneyler sonucunda 200-400 mg/l sitrik asidin *F. oxysporum* f. sp *niveum* gelişimini teşvik ettiğini, 800-1600 mg/l sitrik asidin ise küfün gelişimini önlediğini bildirmişlerdir. Literatürle farklılık gösteren çalışma sonuçlarımız ortaya koymuştur ki, sitrik asitin küf gelişimini inhibe etmesi ya da etmemesi; incelenen küf türü, sitrik asit konsantrasyonu, besiyeri ortamı, sitrik asitin besiyeri ortamında bulunan maddeleri şelatlama yeteneği gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

3.5.3.2 Fitik Asit

Kuru incirden hazırlanan besiyerine 0.175, 0.438 ve 0.875 mM fitik asit ilavesinin küf gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. İnkübasyonun 2 ve 4. günü elde edilen sonuçlar Tablo 3.18'de verilmiştir.

Tablo 3.18: Kuru incirden hazırlanan besiyerinde fitik asitin küf gelişimi üzerine etkisi*

Konsantrasyon	%İnhibisyon	
	2.gün	4.gün
Kontrol	0±0 c	0±0 a
0.175 mM	1.62±2.42 bc	0±0 a
0.438 mM	7.03±3.08 a	0.13±0.29 a
0.875 mM	4.86±2.96 ab	0±0 a

*: Aynı örnekleme günü için farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

Deney sonucuna göre inkübasyonun 2. gününde 0.175 mM fitik asit küf gelişimini %1.62, 0.438 mM fitik asit %7.03 ve 0.875 mM fitik asit %4.86 oranında inhibe etmiştir. İnkübasyonun 2. günü küf gelişimini önlemede en etkili dozun 0.438 mM olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). İnkübasyonun 4. gününde 0.175 ve 0.875 mM'lık fitik asit dozları küf gelişimi üzerine herhangi bir inhibisyon etki göstermezken, 0.438 mM konsantrasyondaki fitik asit küf gelişimini üzerine sınırlı bir etki (%0.13) göstermiştir. Ancak bu etki, istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Yang ve diğ (2015) *in vitro* koşullarda 4 µmol/ml fitik asitin *P. expansum* gelişimini %4.30 oranında inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, aynı fitik asit dozunu elmada denemişler ve fitik asitin küflenmeyi %72.59 oranında önlediğini bulmuşlardır. Çalışmamızda elde edilen bulgular bu çalışma ile kıyaslandığında, fitik asitin inhibisyon etkisinin; küfün gelişimi için

substrat olarak kullanacağı maddelere göre (besiyeri ortamında bulunan maddeler, meyve bileşiminde bulunan maddeler vb.) farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

3.5.3.3 EDTA

Kuru incirden hazırlanan besiyerine 0.175, 0.875 ve 1.75 mM EDTA ilavesinin küf gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. İnkübasyonun 2 ve 4. günü elde edilen sonuçlar Tablo 3.19'da verilmiştir.

Tablo 3.19: Kuru incirden hazırlanan besiyerinde EDTA'nın küf gelişimi üzerine etkisi*

Konsantrasyon	%İnhibisyon	
	2.gün	4.gün
Kontrol	0±0 c	0±0 c
0.175 mM	0±0 c	0±0 c
0.875 mM	10.39±1.78 b	5.47±1.46 b
1.75 mM	20.78±3.88 a	18.56±2.50 a

*: Aynı örnekleme günü için farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

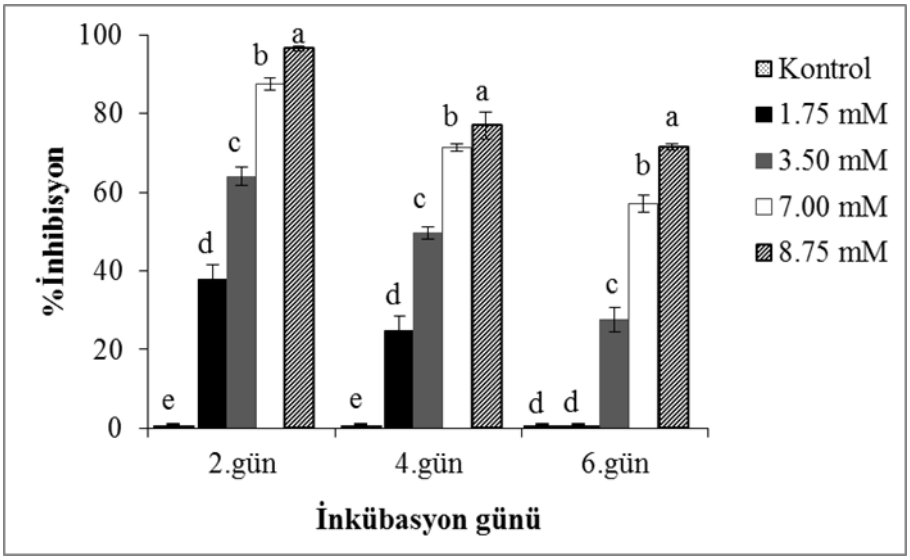
Deney sonucuna göre inkübasyon süresi boyunca 0.175 mM EDTA küf gelişimi önlemede etkili bulunmamıştır. Ancak, EDTA'nın besiyeri ortamında dozunun artırılmasıyla küf gelişimi üzerinde belirli bir süre inhibisyon etki gösterdiği gözlenmiştir. İnkübasyonun 2. günü 0.875 mM EDTA küf gelişimini %10.39, 1.75 mM EDTA ise %20.78 oranında inhibe etmiştir. İnkübasyonun 4. günü bu oranlar sırasyla %5.47 ve %18.56'ya düşmüştür. Her 2 günde de 1.75 mM EDTA 0.875 Mm EDTA'ya göre küf gelişimini önlemede daha etkili bulunmuştur ($p<0.05$). İnkübasyonun 6. gününde; EDTA'nın denenen hiçbir dozu küf gelişimi üzerine herhangi bir inhibisyon etki göstermemiştir. Kim ve diğ. (2016) EDTA'nın pirinçte bakanae (düzensiz büyüme) hastalığına neden olan *F. fujikuroi* küf türüne karşı fungistatik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar *in vitro* koşullarda gerçekleştirdikleri çalışmalarında EDTA'nın bu etkisini besiyerindeki mineral maddelerin (kalsiyum, mangan vb.) kullanımını baskılamasına atfetmişlerdir. Türkkan ve Erper (2015) *in vitro* koşullarda %0.1'den daha fazla EDTA'nın *F. equiseti, F. proliferatum, F. semitectum, F. solani* f. sp. *phaseoli, F. verticillioides, Rhizoctonia solani* AG4–HG I, *Macrophomina phaseolina* ve *Sclerotium rolfsii*

gelişimine karşı fungi-toksik etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ancak, *in vivo* deneylerde %1-2 EDTA'nın hem fasulye tohumunun çimlenmesi hem de kök uzaması açısından fitotoksik özellikte olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmadan da anlaşılacağı gibi, EDTA'nın hem küf gelişimini önlemesi hem de bitki sağlığını koruması için optimum dozunu belirlemek oldukça önemlidir.

Kuru incirden hazırlanan besiyerinde EDTA şelat ajanının küf gelişimini önlemede etkisini artırmak için besiyerine katkılanan EDTA dozunun artırılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla, sonraki deneylerde suda çözünürlüğü EDTA'dan daha yüksek olan Na_2-EDTA kullanılmıştır.

3.5.3.3.1 Na_2-EDTA

Kuru incirden hazırlanan besiyerine 1.75, 3.50, 7.00 ve 8.75 mM Na_2-EDTA ilavesinin küf gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.15'te gösterilmiştir.



Şekil 3.15: Kuru incirden hazırlanan besiyerinde Na_2-EDTA'nın küf gelişimini inhibe etme yüzdesi

*: Aynı örnekleme günü için farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

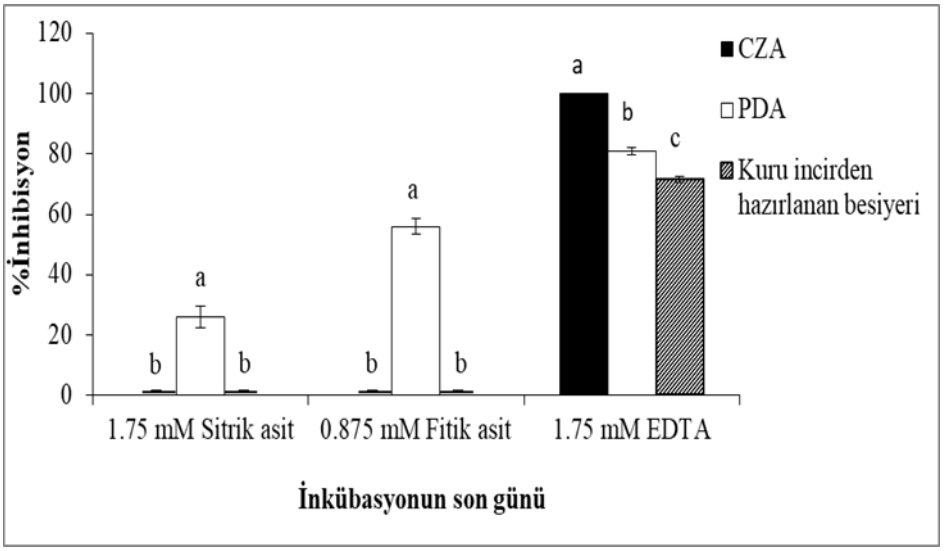
Kuru incirden hazırlanan besiyerinde Na_2-EDTA, denenen dozlarda küf gelişimini önlemede etkili bulunmuştur. Na_2-EDTA'nın inkübasyon süresinin başında küf gelişimini daha fazla oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir. EDTA'nın

inhibisyon etkisi, denenen her bir EDTA dozu için inkübasyon süresi boyunca giderek azalmıştır. Bunun nedenlerinden biri olarak, EDTA'nın küfün gelişmesi için besiyeri ortamına uyum sağlama sürecini uzattığı bir diğer ifadeyle küfün lag periyodunu uzattığı düşünülmektedir. Besiyeri ortamına uyum sağlayan küf, gelişimini EDTA'nın sınırlandırdığı ölçüde devam etmiştir. İkinci muhtemel nedenin ise, EDTA'nın besiyeri ortamındaki maddeler ile (mineral maddeler, azot kaynakları vb.) şelat oluşturma yeteneğinin zamanla azalmış olabileceğidir.

İnkübasyonun 2 ve 4. günü 1.75 mM Na_2-EDTA küf gelişimini sırasıyla %37.89 ve %24.70 oranında inhibe ederken inkübasyonun 6. günü inhibe etmemiştir. Na_2-EDTA'nın 3.50 mM'lık konsantrasyonu küf gelişimini %27.63-63.98, 7.00 mM'lık konsantrasyonu %56.97-87.58 ve 8.75'lık konsantrasyonu %71.58-96.58 oranında inhibe etmiştir. Besiyerine katkılanan Na_2-EDTA'nın konsantrasyonu arttıkça küf gelişimini önlemedeki etkisi artmıştır. İnkübasyon süresi boyunca küf gelişimini önlemede en etkili doz, denenen en yüksek doz olan 8.75 mM olarak tespit edilmiştir ($p<0.05$). Basaran (2011) *in vitro* koşullarda %4 Na_2-EDTA'nın *A. parasiticus* gelişimini önlemede EDTA'ya göre daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamızda benzer sonuca ulaşılmıştır. Şöyle ki; inkübasyonun 2 ve 4. günü 1.75 mM EDTA'nın küf gelişimini sırasıyla %20.78 ve 18.56 oranında, Na_2-EDTA'nın ise 37.89 ve %24.70 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. Elde edilen bu bulgu, Na_2-EDTA'nın *A. flavus* gelişimini önlemede EDTA'dan daha etkili olduğunun göstergesidir. EDTA'nın bu etkisi hücre döngüsündeki metal iyonlarını uzaklaştırarak hayati enzim aktivitelerini azalttığına dayandırılmıştır (Basaran 2011).

Literatürde Na_2-EDTA'nın *C. albicans* üzerine antifungal etkisinin incelendiği çalışmalar mevcuttur. Casalinuova ve diğ. (2017) *in vitro* koşullarda 2.5- ve 25 mM Na_2-EDTA'nın *C. albicans* gelişimini inhibe ettiğini tespit etmiştir. Benzer bir sonuç Sen ve diğ. (2000)'nin yaptığı çalışmadan da elde edilmiştir. Araştırmacılar, Na_2-EDTA'nın inhibisyon etkisini hücre duvarından Ca^{+2} iyonlarını uzaklaştırarak hücre duvarının kararlılığını bozmasına ve ortamdaki Ca^{+2} iyonlarını bağlayarak enzimatik reaksiyonları önlemesine atfetmişlerdir. Literatürden ve tez çalışmamızdan elde ettiğimiz bu bulgular EDTA'nın ve sodyum tuzlarının belirli bazı küfler ve mayalar üzerine güçlü bir antifungal etkisi olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, farklı besiyerlerine ilave edilen en yüksek şelat ajanı dozlarının küf gelişimini inhibe etmede etkisi Şekil 3.16'da şematize edilmiştir.



Şekil 3.16: Farklı besiyerlerine katkılanan şelat ajanlarının küf gelişimini inhibe etme yüzdesi*,**,***

*: Şekilde inkübasyonun son günü olan 6. güne göre %inhibisyon değerleri verilmiştir. Yalnızca kuru incirden hazırlanan besiyerine sitrik asit ve fitik asit katkılandığında inkübasyon 4 gün sürdüğü için 4. gün verileri kullanılmıştır.

**Kuru incirden hazırlanan besiyerinde 8.75 mM Na_2-EDTA'nın %inhibisyon değeri gösterilmiştir.

***: Aynı şelat ajanı için farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

Şekil 3.16'da görüldüğü üzere, EDTA her besiyerinde %70'in üzerinde inhibisyon etki göstermiştir. EDTA'nın bu etkisi besiyerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, EDTA küf gelişimini CZA besiyerinde tamamen inhibe ederken PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerinde sırasıyla %81.02 ve 71.58 oranında inhibe etmiştir. EDTA'nın katkılandığı farklı besiyerlerinden elde edilen inhibisyon verileri arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmuştur ($p<0.05$). Çalışmamızda denenen diğer şelat ajanlarından sitrik asit ve fitik asit PDA besiyerlerinde belirli bir düzeyde inhibisyon etki (%26 ve 56) gösterirken CZA ve kuru incirden hazırlanan besiyerlerinde herhangi bir inhibisyon etki göstermemiştir ($p>0.05$).

Farklı besiyerlerinde aynı şelat ajanının küf gelişimi üzerine farklı etki göstermesinin nedeninin besiyerlerinin bileşimindeki farklılık olduğu açıktır. Örneğin, CZA besiyerinde yegane karbon kaynağı sukroz iken, PDA besiyerinde temel karbon kaynağı glukozdur. Kuru incirden hazırlanan besiyerinde ise temelde

sadece glukoz ve fruktoz bulunmakta, sukroz ise ihmal edilebilecek iz düzeyde bulunmaktadır (Çalışkan ve Polat 2012). Ayrıca CZA besiyerinde küf, azot kaynağı olarak nitratı kullanmaktadır. PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerlerinin ham maddeleri olan patates ve kuru incirin bileşimi dikkate alındığında küfün azot kaynağı olarak PDA besiyerinde metionin, sistein vb. aminoasitleri, kuru incirden hazırlanan besiyerinde ise aspartik asit, glutamin vb. aminoasitleri kullanması muhtemeldir. Aynı şekilde küf gelişimi için besiyerinde gerekli olan vitamin ve mineralleri değerlendirecek olursak; patates ve kuru incirin B grubu vitaminlerce oldukça zengin olduğu bilinmektedir. Patates ayrıca iyi bir P ve Mg kaynağıdır. Kuru incir ise Ca, K başta olmak üzere P ve Mg açısından zengindir (Karadoğan ve Özer 1997, Silva ve diğ. 2009). Herhangi bir gıda ekstraktı içermeyen CZA besiyeri, bileşiminde belirli miktarda Na, Mg, K ve Fe gibi mineral maddeleri bulundururken herhangi bir vitamin kaynağı bulundurmamaktadır.

Tez çalışmamız kapsamında CZA, PDA ve kuru incirden hazrlanan besiyerine sitrik asit, fitik asit ve EDTA şelat ajanları katkılanmış ve söz konusu bu şelat ajanlarının *A. flavus* gelişimi üzerine etkisi inkübasyonun 2, 4 ve 6. günü takip edilmiştir. Elde edilen %inhibisyon değerleri Tablo 3.20, 3.21, 3.22 ve 3.23'te özetlenmiştir.

Tablo 3.20: Kuru incirden hazırlanan besiyerinde Na_2-EDTA'nın küf gelişimi üzerine etkisi

Konsantrasyon	**% İnhibisyon**		
	2.gün	**4.gün**	**6.gün**
1.75 mM	37.89±3.64	24.70±3.85	0±0
3.50 mM	63.98±2.30	49.67±1.46	27.63±3.09
7.00 mM	87.58±1.55	71.43±0.87	56.97±2.16
8.75 mM	96.58±0.69	76.95±3.56	71.58±0.86

Tablo 3.21: Kuru incirden hazırlanan besiyerine katkılanan şelat ajanlarının küf gelişimi üzerine etkisi

İnkübasyon günü	%İnhibisyon								
	Sitrik asit			Fitik asit			EDTA		
	0.175 mM	0.875 mM	1.75 mM	0.175 mM	0.438 mM	0.875 mM	0.175 mM	0.875 mM	1.75 mM
2. gün	2.65±1.18	4.76±2.64	0.42±0.95	1.62±2.42	7.03±3.08	4.86±2.96	0±0	10.39±1.78	20.78±3.88
4. gün	0±0	0.13±0.29	0±0	0±0	0.13±0.29	0±0	0±0	5.47±1.46	18.56±2.50

Tablo 3.22: PDA besiyerine katkılanan şelat ajanlarının küf gelişimi üzerine etkisi

İnkübasyon günü	%İnhibisyon								
	Sitrik asit			Fitik asit			EDTA		
	0.175 mM	0.875 mM	1.75 mM	0.175 mM	0.438 mM	0.875 mM	0.175 mM	0.875 mM	1.75 mM
2. gün	4.67±2.56	8.41±2.56	16.82±2.09	12.39±4.27	26.50±3.58	41.88±3.82	35.51±7.68	70.09±2.56	83.64±2.34
4. gün	9.68±2.63	15.73±2.63	23.39±4.03	11.34±3.62	30.77±3.62	50.20±4.44	41.20±6.87	71.20±2.95	82.20±0.84
6. gün	12.67±2.69	16.25±2.46	26.17±3.59	14.57±4.33	27.43±4.33	56.00±2.56	41.71±4.78	70.19±1.54	81.02±1.21

Tablo 3.23: CZA besiyerine katkılanan şelat ajanlarının küf gelişimi üzerine etkisi

İnkübasyon günü	%İnhibisyon								
	Sitrik asit			Fitik asit			EDTA		
	0.175 mM	0.875 mM	1.75 mM	0.175 mM	0.438 mM	0.875 mM	0.175 mM	0.875 mM	1.75 mM
2. gün	1.96±3.30	0.43±0.97	0±0	2.35±3.22	0±0	0±0	72.47±6.60	91.67±2.49	100±0
4. gün	0.09±0.20	0±0	0±0	0.62±1.38	0±0	0±0	63.36±2.06	91.94±1.15	100±0
6. gün	0.80±0.18	0±0	0±0	0.16±0.22	0±0	0±0	69.19±1.76	92.57±0.48	100±0

3.5.4 Şelat Ajanı Katkılanan Besiyerlerinin pH Ölçüm Sonuçları

Çalışmamızda şelat ajanı katkılanan besiyerlerinin pH değerlerinin küf gelişimi üzerinde etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir. Toksijenik *A. flavus* küfünün gelişimi için gerekli pH değeri 3.4-10.0 aralığındadır (Fratamico ve diğ. 2005). Holmquist ve diğ. (1983) SDA besiyeri ve mısırda pH 5 değerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un maksimum düzeyde gelişim gösterdiğini gözlemişlerdir. Besiyerine katkılanan şelat ajanlarının şelatlama yeteneği pH değerine göre farklılık gösterebilmektedir. Sitrik asitin düşük pH'larda, fitik asitin orta ve yüksek pH'larda, EDTA'nın ise yüksek pH'larda daha fazla şelatlama özelliği gösterdiği bilinmektedir (Gür ve Demirdağ 2009). Çalışmamızda, besiyerine katkılanan ajanlarının şelatlama yeteneğinin pH değerine göre farklılık göstermesi mümkün olduğundan besiyerlerinde pH ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.24'te verilmiştir.

Besiyerlerine katkılanan tüm şelat ajanları besiyeri ortamlarının pH'sının düşmesine neden olmuştur. Genellikle şelat ajanının besiyerine katkılanan miktarı arttıkça pH değerinde daha fazla düşüş meydana gelmiştir. Bu durum, çalışmamızda kullanılan her besiyerinde, küf gelişimini önlemede diğer ajanlardan daha etkili bulunanan EDTA için de geçerlidir. EDTA'nın bazik ortamlarda daha iyi şelatlama etkinliği gösterdiği bilindiğinden (Gür ve Demirdağ 2009); söz konusu ajanın küf gelişimini inhibe etme etkisi üzerine şelatlama özelliğinin dışında başka faktörlerin de etkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda, PDA besiyerine sitrik asit ve fitik asitin katkılanmasıyla en düşük pH değerleri (sırasıyla 4.47 ve 3.82) elde edilmiştir. Bunun yanı sıra, bu ajanların söz konusu besiyerinde küf gelişimini inhibe etmede etkili olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında; sitrik asitin küf gelişimini inhibe etme etkisi muhtemel iki mekanizma üzerinden düşünülebilir. Bu mekanizmalardan ilki, bu ajanın düşük pH'larda sahip olduğu yüksek şelatlama özelliği nedeniyle küf gelişimi için gerekli maddeler ile kuvvetli şelatlar oluşturmasıdır. İkincisi ise, ajanın hücre içi asitliğini artırarak hücreler arası pH dengesini bozmasıdır. İkinci mekanizmanın fitik asitin küf gelişimini inhibe etme etkisi üzerinde de etkili olduğu düşünülmektedir.

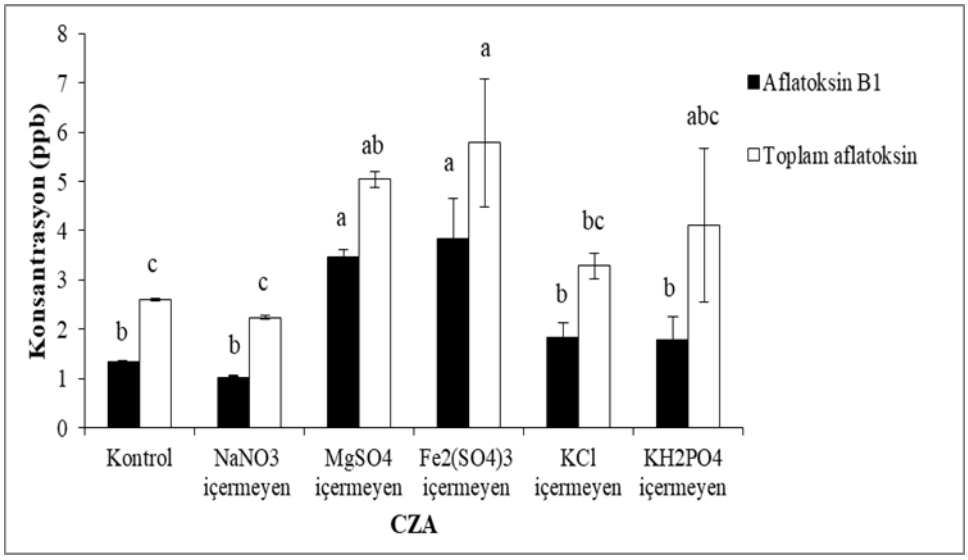
Tablo 3.24: Şelat ajanı katkılanan besiyerlerinin pH ölçüm sonuçları

Besiyeri	Şelat ajanı	Konsantrasyon	pH
CZA	Sitrik asit	Kontrol	7.23±0.01
		0.175 mM	7.12±0.00
		0.875 mM	6.67±0.01
		1.75 mM	6.23±0.01
	Fitik asit	Kontrol	7.22±0.01
		0.175 mM	7.08±0.01
		0.438 mM	6.56±0.00
		0.875 mM	5.65±0.01
	EDTA	Kontrol	7.21±0.01
		0.175 mM	7.29±0.01
		0.875 mM	6.84±0.01
		1.75 mM	5.69±0.02
PDA	Sitrik asit	Kontrol	5.60±0.02
		0.175 mM	5.39±0.02
		0.875 mM	4.85±0.02
		1.75 mM	4.47±0.01
	Fitik asit	Kontrol	5.43±0.01
		0.175 mM	4.92±0.01
		0.438 mM	4.42±0.01
		0.875 mM	3.82±0.01
	EDTA	Kontrol	5.39±0.01
		0.175 mM	4.97±0.02
		0.875 mM	4.61±0.02
		1.75 mM	4.29±0.01
Kuru incirden hazırlanan besiyeri	Sitrik asit	Kontrol	4.89±0.01
		0.175 mM	4.83±0.01
		0.875 mM	4.77±0.01
		1.75 mM	4.64±0.01
	Fitik asit	Kontrol	4.90±0.01
		0.175 mM	4.82±0.02
		0.438 mM	4.72±0.01
		0.875 mM	4.52±0.01
	EDTA	Kontrol	4.57±0.01
		0.175 mM	4.62±0.01
		0.875 mM	4.34±0.01
		1.75 mM	4.35±0.01
	Na_2-EDTA	Kontrol	4.90±0.01
		1.75 mM	4.79±0.01
		3.50 mM	4.71±0.01
		7.00 mM	4.66±0.01
		8.75 mM	4.61±0.00

3.6 Besiyeri Örneklerinde Aflatoksin Analizi Sonuçları

3.6.1 *A. flavus* İnoküle Edilmiş Farklı Besiyeri Ortamlarında Aflatoksin Miktarının Belirlenmesi

Çalışmamızda, mineral maddelerin aflatoksin oluşumu üzerine etkisini tespit etmek amacıyla, CZA besiyeri bileşiminde bulunan $NaNO_3$, $MgSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$, KCl ve KH_2PO_4 mineral bileşiklerinin besiyeri ortamından çıkarılmasıyla hazırlanan modifiye besiyerlerinde aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.17'de verilmiştir.



Şekil 3.17: Mineral maddelerin aflatoksin oluşumu üzerine etkisi*
*Mineral maddeler çıkarılarak hazırlanan modifiye besiyerlerinde farklı harflerle gösterilen aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

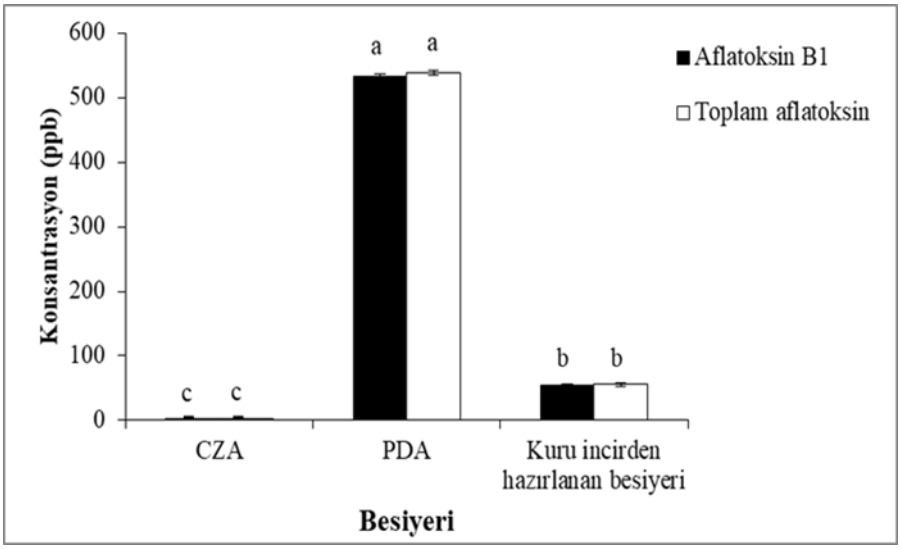
Modifiye besiyerlerinde gerçekleştirilen aflatoksin analizlerinde, kontrol grubu (CZA) besiyerinde aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin (aflatoksin $B_1+B_2+G_1+G_2$) miktarı sırasıyla 1.34±0.00 ve 2.61±0.03 ppb olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu besiyeri ile kıyaslandığında, CZA besiyerinden $NaNO_3$, KCl ve KH_2PO_4 bileşiklerinin çıkarılması küf tarafından üretilen aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarını etkilemezken ($p>0.05$), $MgSO_4$ ve $Fe_2(SO_4)_3$ bileşiklerinin çıkarılmasıyla aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarının arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Besiyeri bileşiminden $MgSO_4$ ve $Fe_2(SO_4)_3$ bileşiklerinin çıkarılması durumunda aflatoksin B_1 miktarı sırasıyla 3.46±0.16 ve 3.84±0.81 ppb bulunurken,

toplam aflatoksin miktarı sırasıyla 5.05±0.16 ve 5.78±1.30 pbb olarak bulunmuştur. Literatürde, besiyeri bileşimine belirli miktarda katkılanan Mg ve Fe mineral maddelerinin *A. flavus* ve *A. parasiticus* tarafından üretilen aflatoksin miktarını azalttığına (Marsh ve diğ. 1975, Tiwari ve diğ. 1986, Cuero ve diğ. 2003) veya artırdığına dair çalışmalar mevcuttur (Davis ve diğ. 1967, Reddy ve diğ. 1979). Maggon ve diğ. (1973) besiyeri ortamında bulunan Fe'in aflatoksin miktarını artırmasını, lipid oksidasyonu reaksiyonlarında bu bileşiğin üstlendiği "katalizör rolü" ile ilişkilendirmişlerdir. Araştırmacılar, lipid oksidasyonu sonucu oluşan ketonların aflatoksin biyosentezinin öncü bileşikleri olduğunu ifade etmişler ve söz konusu bileşiklerin aflatoksin üretimini artırabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın, "3.2 Mineral Maddelerin *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi" başlığı altında detayları verilen çalışma kapsamında, 6 günlük inkübasyon süresi boyunca $NaNO_3$ bileşenini içermeyen besiyerinde, küfün gelişimi için başka bir azot kaynağı olmadığından dolayı *A. flavus* gelişiminin gözlenmediği ifade edilmiştir. Aynı besiyerinde 21 günlük inkübasyon süresi sonunda gerçekleştirilen aflatoksin analizleri sonucunda aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarlarının sırasıyla 1.03±0.01 ve 2.24±0.03 ppb düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Söz konusu besiyerinde tespit edilen aflatoksin miktarları kontrol grubu besiyerinde tespit edilen miktarlar ile kıyaslandığında neredeyse aynı düzeyde bulunmuştur ($p>0.05$). Bu durum, gelişmek için besiyeri ortamında azot kaynağı bulamayan küfün strese girdiğini ve buna bağlı olarak da aflatoksin ürettiğini düşündürmektedir. Küfün gelişimini olumsuz yönde etkileyecek faktörlerin (kuraklık, ortamda gelişmek için ihtiyaç duyulan maddelerin eksikliği vb.) küf üzerinde strese neden olduğu ve stresin küfü toksin üretmeye teşvik ettiği belirtilmiştir (Guo ve diğ. 2008, Schmidt-Heydt ve diğ. 2008). Besiyerinde bulunan nitratın küf gelişimi ve toksin oluşumu için azot kaynağı olmasının yanı sıra aflatoksin oluşumunu baskıladığı ortaya konmuştur (Kachholz ve Demain 1983). Ehrlich ve Cotty (2002) nitratın aflatoksin biyosentezinde rol alan genleri baskılayarak aflatoksin ürettimini azalttığını ifade etmişlerdir.

3.6.2 Farklı Besiyerlerinde *A. flavus* Küfünün Aflatoksin Üretimi

CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerinde *A. flavus* tarafından üretilen aflatoksin miktarı tespit edilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.18'de verilmiştir.



Şekil 3.18: Farklı besiyerlerinde geliştirilen *A. flavus*'un aflatoksin üretimi*
*: Farklı besiyerlerinde farklı harflerle gösterilen aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

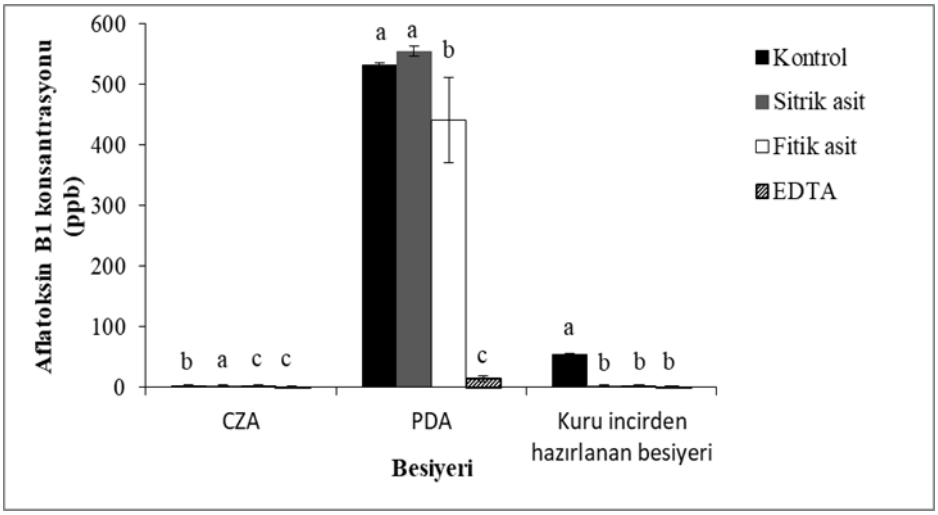
Şekil 3.18'de görüldüğü üzere, *A. flavus* küfü tarafından üretilen aflatoksin miktarları en fazla PDA besiyerinde tespit edilmiştir ($p<0.05$). PDA besiyerinde üretilen aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarı sırasıyla 532.95±3.35 ve 538.14±3.58 ppb bulunmuştur. PDA besiyerini sırasıyla kuru incirden hazırlanan besiyeri ve CZA besiyeri takip etmiştir. Kuru incirden hazırlanan besiyerinde üretilen aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarı sırasıyla 53.69±2.56 ve 55.87±2.58 ppb bulunurken, CZA besiyerinde bu miktarlar sırasıyla 1.13±0.05 ve 2.47±0.11 pbb olarak bulunmuştur. Fakruddin ve diğ. (2015) CZA besiyerinde *A. flavus* suşlarının en fazla 0.03 ppb aflatoksin B_1 ürettiğini tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışmada, Riba ve diğ. (2010) CYA besiyerinde *Aspergillus flavi* üyesine ait bazı küf türlerinin en fazla 0.24 ppb aflatoksin B_1 ürettiğini bulmuşlardır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile kendi çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, CZA besiyerinin aflatoksin üretimi için uygun bir besiyeri olmadığını göstermiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar, besiyerinde üretilen aflatoksin miktarının küf türüne ve suşa bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızda, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerlerinin CZA besiyerine göre aflatoksin oluşumu için daha elverişli olduğu ortaya konmuştur. Söz konusu besiyerleri küf gelişimi açısından değerlendirildiğinde de aynı yargıya ulaşılmıştır (bkz. "3.4 Farklı Besiyerlerinde *A. flavus* Gelişimi" konu başlıklı bölüm). Besiyerlerinin bileşimindeki farklılıkların (karbon, azot kaynağı ve vitamin, mineral madde içeriğindeki farklılıklar vb.) küf gelişimi ve toksin oluşumunu etkilediği düşünülmektedir. Davis ve diğ. (1967) besiyeri bileşimini oluşturan maddelerin farklılık göstermesinin *A. flavus* gelişimini ve aflatoksin oluşumunu etkilediğini ortaya koymuşlardır. Yazarlar çalışmalarında, en fazla küf gelişimini besiyeri ortamında karbon kaynağı olarak fruktozun varlığında tespit ederken, en fazla aflatoksin üretimini ise glukoz ve sukrozun varlığında tespit etmişlerdir. Küfün, besiyerinde azot kaynağı olarak maya ekstraktı, pepton ve aminoasitlerin varlığında iyi düzeyde gelişim gösterdiği ancak, en fazla aflatoksin üretiminin aspartik asit, glisin, glutamin, glutamatik asit gibi aminoasitlerin varlığında bulunduğu ifade edilmiştir. Aynı çalışmada, besiyeri bileşiminde bulunan mineral maddelerin küf gelişimi ve aflatoksin oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde ise; besiyerinden magnezyum, çinko ve demirin çıkarılmasının küf gelişimini ve aflatoksin oluşumunu azalttığı, bakırın çıkarılmasının ise tam tersi yönde etki ettiği tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında test edilen üç besiyerinin (CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyeri) kompozisyonunun karbon ve azot kaynakları, vitamin ve mineral madde içerikleri yönünden birbirinden çok farklı olduğu açıktır. Bu farklılıkların, besiyerlerinde *A. flavus*'un farklı miktarda aflatoksin üretmesine neden olduğu düşünülmektedir.

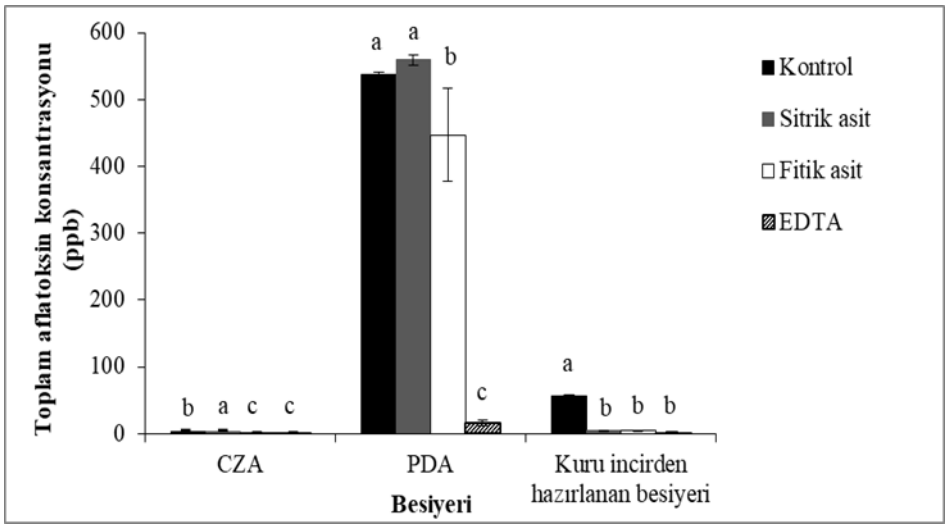
3.6.3 Farklı Besiyerlerine Şelat Ajanı İlavesinin Aflatoksin Oluşumu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Çalışmamızda küf gelişimini önlemek amacıyla denenen şelat ajanlarının en yüksek dozu (sitrik asit ve EDTA için 1.75 mM, fitik asit için 0.875 mM) CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerlerine katkılanmış ve söz konusu ajanların aflatoksin oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.19'da verilmiştir. Çalışmamızda, şelat ajanları katkılanmış besiyerlerinde yapılan aflatoksin

analizi sonuçlarına göre, Şekil 3.19'da görüldüğü gibi, incelenen her besiyerinde aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarı için aynı eğilim gözlenmiştir.



(a)



(b)

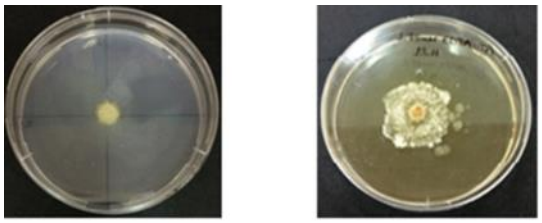
Şekil 3.19: Farklı besiyerlerine katkılanan şelat ajanlarının aflatoksin oluşumu üzerine etkisi* a) Şelat ajanlarının aflatoksin B_1 oluşumu üzerine etkisi, b) Şelat ajanlarının toplam aflatoksin oluşumu üzerine etkisi.

*****: Aynı besiyeri için, farklı harflerle gösterilen aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

Farklı şelat ajanlarının aflatoksin oluşumu üzerine etkisi, deneylerde kullanılan besiyerlerine göre değişkenlik göstermiştir. Örneğin; kuru incirden hazırlanan besiyerinde, sitrik asit katkılı örnekte tespit edilen aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarı kontrol örneğine göre sırasıyla %94.97 ve 92.48 oranında daha az bulunmuştur. Aynı şelat ajanı; PDA besiyerine katkılandığında, aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarı bakımından kontrol örneğine göre istatistiksel açıdan

önemli bir fark yaratmazken ($p>0.05$), CZA besiyerine katkılandığında küf tarafından üretilen aflatoksin miktarını istatistiksel açıdan önemli düzeyde artırmıştır ($p<0.05$). Çalışmamızda, CZA besiyerinde tespit edilen aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarı sırasyla 1.23±0.06 ve 2.66±0.19 ppb olarak bulunmuştur. Söz konusu besiyerine sitrik asitin katkılanması halinde bu değerler sırasıyla 1.68±0.14 ve 2.90±0.13 ppb olarak belirlenmiştir. CZA besiyerine %0.4 düzeyinde katkılanan sitrik asitin aflatoksin üretimini teşvik ettiği Wildman ve diğ. (1967) tarafından da bildirilmiştir.

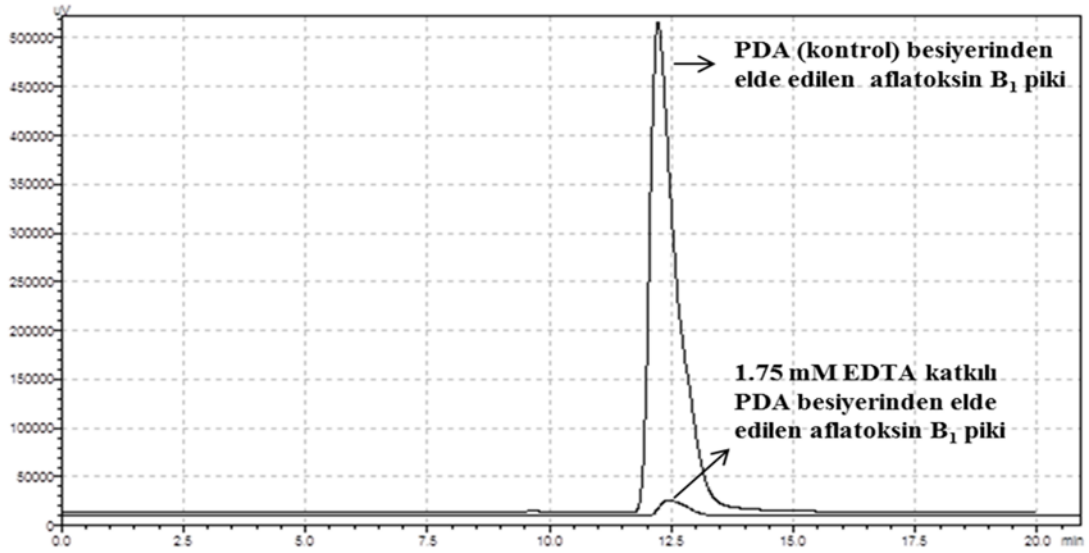
Bu çalışmanın, "3.5.1 CZA Besiyerine İlave Edilen Şelat Ajanlarının *A. flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi" başlığı altında yer alan deneylerin sonuçlarından biri, küf gelişiminin takibinin yapıldığı 6 günlük inkübasyon süresince EDTA katkılı CZA besiyerinde *A. flavus* gelişiminin gözlenmediğidir. Ancak, söz konusu besiyerinde aflatoksin miktarını belirlemek için 21 güne uzatılan inkübasyon süresinin sonunda küf gelişimi tespit edilmiştir. İnkübasyonun 6 ve 21. günü gözlenen küf gelişimi Şekil 3.20'de verilmiştir. CZA besiyerinde 6 günlük inkübasyon süresince küf gelişimini tamamen inhibe eden EDTA'nın 21 günlük inkübasyon periyodunun sonunda *A. flavus* tarafından üretilen aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarını yaklaşık %16 oranında azalttığı bulunmuştur. Çalışmamızda, söz konusu besiyerine fitik asitin katkılanması durumunda ise aflatoksin miktarının aynı oranda azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.20: EDTA katkılanan CZA besiyerinde *A. flavus* gelişimi a) İnkübasyonun 6. günü *A. flavus* gelişimi, b) İnkübasyonun 21. günü *A. flavus* gelişimi.

CZA besiyerinde üretilen aflatoksin miktarını azaltmada etkili bulunan fitik asit ve EDTA şelat ajanları, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerinde de etkili bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak söz konusu ajanların bu etkisinin, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerinde CZA besiyerine göre daha fazla düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Küf gelişimini takip etmek için yaygın olarak kullanılan PDA

besiyerine katkılanan fitik asit ve EDTA aflatoksin miktarını istatistiksel açıdan önemli düzeyde azaltmıştır ($p<0.05$). Besiyerine fitik asit ve EDTA'nın katkılanması hem aflatoksin B_1 hem de toplam aflatoksin miktarını sırasıyla %17 ve 97 oranında sınırlandırmıştır. Şekil 5.21'de PDA besiyerine katkılanan EDTA'nın kontrol grubu besiyerine göre aflatoksin B_1'in miktarını azaltmadaki etkisi görülmektedir. Benzer sonuca aflatoksin oluşumu için oldukça riskli bir ürün olan kuru incirden hazırlanan besiyerinde ulaşılmıştır. Söz konusu besiyerine fitik asit ve EDTA'nın katkılanması hem aflatoksin B_1 hem de toplam aflatoksin miktarını %90'dan daha fazla oranda azaltmıştır.



Şekil 3.21: PDA besiyerine katkılanan EDTA'nın kontrol grubu besiyerine göre aflatoksin B_1'in miktarını azaltmadaki etkisi

Tez çalışmamız kapsamında yaptığımız deneylerde, PDA besiyerinde inkübasyonun son günü (6. gün) fitik asit ve EDTA'nın küf gelişimini sırasıyla %56.00 ve 83.64 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar doğrultusunda, PDA besiyerinde fitik asit ve EDTA'nın aflatoksin oluşumunu önlemedeki rolünün küf gelişimi inhibe etmede etkili olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Fitik asitin aflatoksin oluşumunu önlemedeki diğer bir rolü ise, besiyeri ortamındaki metallerle şelat oluşturarak aflatoksin sentezinde rol alan enzimlerin aktivitesinin azalmasına ya da kaybolmasına neden olmasıdır (Dayi ve diğ. 1995). Nitekim, çalışmamızda kuru incirden hazırlanan besiyerinde fitik asit küf gelişimini inhibe etmede etkili bulunmazken aflatoksin oluşumunu önlemede etkili bulunmuştur. Benzer sonuca söz konusu besiyerine sitrik asitin katkılanmasıyla ulaşılmıştır. Kuru incirden hazırlanan besiyerinde sitrik asitin aflatoksin miktarını

azaltması iki mekanizma ile açıklanabilir. Bu mekanizmalardan birincisi; sitrik asitin ortamın pH'sını düşürerek bir diğer ifadeyle asitliğini arttırarak aflatoksin biyosentezini önlemesidir (Reiss 1976). Reddy ve diğ. (1979) besiyerinde karbon kaynağı olarak sukroz, glukoz, fruktoz vb. şekerlerin yerine sitrik asitin kullanılması durumunda küfün daha az aflatoksin ürettiğini tespit etmişlerdir. İkinci muhtemel mekanizma ise; sitrik asitin besiyerindeki aflatoksinleri parçalamasıdır ki, literatürde sitrik asitin aflatoksinleri parçaladığına dair birçok çalışma mevcuttur (Safara ve diğ. 2010, Lee ve diğ. 2015, Rastegar ve diğ. 2017).

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada öncelikle, önemli bir aflatoksin üreticisi küf olan *A. flavus*'un gelişmesi ve toksin üretmesi için hangi mineral maddeye/maddelere ihtiyaç duyduğunun tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu tespiti yapabilmek için, yapısında incelenecek mineral maddeleri (Na, Mg, Fe ve K) ayrı ayrı birer bileşen olarak bulunduran CZA besiyeri kullanılmıştır. Söz konusu besiyerinin bileşiminden $NaNO_3$, $MgSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$, KCl ve KH_2PO_4 bileşikleri ayrı ayrı çıkarılarak modifiye besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan modifiye besiyerlerinde küf gelişimi ve toksin oluşumu takip edilmiştir. İkinci olarak, gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan şelat ajanlarından olan sitrik asit, fitik asit ve EDTA'nın CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerlerinde küf gelişimi ve toksin oluşumu üzerine etkisi ortaya konmaya çalışılmıştır. Bunun için, çalışmamızda denenen üç besiyerine belirli miktarda (0.175-1.75 mM) şelat ajanı katkılanmış ve küf gelişiminin takibi yapılmıştır. Küf gelişimini önlemede denenen şelat ajanlarının en yüksek dozu aflatoksin analizlerinde denenmiş ve şelat ajanlarının aflatoksin oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca, çalışmamızda CZA, PDA ve kuru incirden hazırlanan besiyerlerinde *A. flavus* gelişimi ve toksin oluşumu her bir besiyeri için ayrı ayrı ele alınmıştır. Tez çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetletmiştir:

(1) CZA besiyeri bileşiminden $NaNO_3$ bileşeninin çıkarılması durumunda küfün 6 günlük inkübasyon periyodu boyunca hiç gelişmediği gözlenmiştir. Çalışmamızda, besiyeri ortamında küfün gelişmemesinin nedeninin; $NaNO_3$ bileşiğindeki NO_3 fraksiyonundan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu bileşik, küfün CZA besiyerinde gelişmek için kullanabileceği tek azot kaynağıdır.

(2) Besiyerinden $NaNO_3$ bileşeninin çıkarılması durumunda küfün gelişmemesine rağmen aflatoksin ürettiği tespit edilmiştir. Küfün, 21 günlük inkübasyon periyodunun sonunda kontrol grubu besiyerinde ürettiği aflatoksin miktarı ile $NaNO_3$ içermeyen besiyerinde ürettiği aflatoksin miktarı arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

(3) Çalışmamızda, incelenen diğer mineral maddelerin besiyeri ortamından çıkarılması durumunda ise kontrol grubu ile modifiye edilen besiyerleri

arasında küf gelişimi açısından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Aflatoksin oluşumu açısından değerlendirme yapıldığında da benzer bir durum söz konusudur. Yalnızca $MgSO_4$ ve $Fe_2(SO_4)_3$ bileşiklerinn besiyeri ortamından çıkarılması aflatoksin B_1 miktarını sırasıyla %158.21 ve %186.57 oranında artırmıştır ($p<0.05$).

(4) Farklı besiyerlerinde *A. flavus* gelişimi incelendiğinde, 6 günlük inkübasyon periyodu boyunca küfün en hızlı kuru incirden hazırlanan besiyerinde gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. Kuru incirden hazırlanan besiyerinin küf gelişimi açısından CZA ve PDA besiyerine göre daha uygun bir ortam olduğu ifade edilmiştir.

(5) Farklı besiyerinde *A. flavus* tarafından üretilen aflatoksin miktarı incelendiğinde, 21 günlük inkübasyon periyodunun sonunda küfün en fazla PDA besiyerinde aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin (sırasıyla 532.14±3.35 ve 538.14±3.58 ppb) ürettiği bulunmuştur ($p<0.05$). En düşük aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarı (sırasıyla 1.13±0.05 ve 2.47±0.11) CZA besiyerinde tespit edilmiştir ($p<0.05$). Söz konusu besiyerinin aflatoksin üretimi için uygun bir besiyeri olmadığı ortaya konmuştur. Çalışmamızda küf gelişimi ve aflatoksin oluşumunun besiyerine göre farklılık göstermesinin nedeninin, besiyerlerinin bileşimindeki karbon ve azot kaynaklarının, mineral maddeler ve vitaminlerin farklılık göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

(6) CZA besiyerine katkılanan şelat ajanlarından küf gelişimini önlemede etkili bulunanan tek ajan EDTA olmuştur. EDTA'nın etkinliği doza bağlı olarak artış göstermiştir. EDTA'nın 1.75 mM'lık konsantrasyonu küf gelişimini tamamen inhibe etmiştir. Bu durumda, EDTA'nın nitratı bağlayarak küfün gelişimi için gerekli olan besiyerindeki tek azot kaynağını kullanamaz hale getirmiş olabileceği akla gelmektedir. Ya da EDTA'nın besiyeri ortamındaki nitratı küf gelişimini inhibe edici özelliğe sahip maddelere indirgemiş olabileceği düşünülmektedir.

(7) CZA besiyerine katkılanan şelat ajanlarının aflatoksin oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde; sitrik asitin aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarını artırdığı, fitik asit ve EDTA'nın ise aynı düzeyde (yaklaşık %16) azalttığı tespit edilmiştir.

(8) PDA besiyerine katkılanan tüm şelat ajanları küf gelişimini önlemede belirli düzeyde etkili bulunmuştur. PDA besiyerinde en yüksek %inhibisyon değerine (%81.02-83.64), besiyerine 1.75 mM EDTA katkılandığında ulaşılmıştır. EDTA'yı sırasıyla fitik asit (%41.88-56.00) ve sitrik asitin (%16.82-26.17) en yüksek dozları takip etmiştir. Aflatoksin analizi sonuçlarına baktığımızda; PDA besiyerine katkılanan sitrik asitin aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarını etkilemediği, fitik asit ve EDTA'nın ise hem aflatoksin B_1 hem de toplam aflatoksin miktarını sırasıyla %17 ve 97 oranında azalttığı belirlenmiştir.

(9) Kuru incirden hazırlanan besiyerine katkılanan sitrik asit ve fitik asit inkübasyonun son günü küf gelişimini önlemede etkili bulunmamıştır. EDTA'nın etkinliği ise denenen dozlarda (0.175-1.75 mM) sınırlı düzeyde kalmıştır. Besiyerine katkılanan EDTA'nın miktarının artırılması etkinliğini de artırmıştır. Besiyerine katkılanan 8.75 mM (denenen en yüksek doz) Na_2-EDTA'nın küf gelişimini %71.58-96.58 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. Söz konusu besiyerine katkılanan şelat ajanlarının aflatoksin oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde, tüm ajanların aflatoksin B_1 ve toplam aflatoksin miktarını %90'dan daha fazla oranda azalttığı tespit edilmiştir.

(10) Elde edilen tüm bu sonuçlar, *in vitro* koşullarda şelat ajanı uygulamalarıyla küf gelişimi ve toksin oluşumunun önlenebileceğini göstermektedir. Ancak, şelat ajanı uygulamalarının küf gelişimi ve toksin oluşumu üzerine etkisi bazı faktörlere göre değişkenlik göstermektedir. Bu faktörler arasında, deneylerde kullanılacak küf türü ve suşu, besiyeri, şelat ajanı ve dozu vb. sayılabilir. Tüm bu faktörlerin göz önünde bulundurulup optimize edilmesi durumunda başarılı sonuçlar elde edilmesi mümkündür.

(11) Çalışmamızda *in vitro* koşullarda başarılı bulunan şelat ajanlarının başta kuru incir olmak üzere aflatoksin problemi yaşadığımız kırmızı biber, fındık, antep fıstığı vb. ürünlerde denenmesi ön görülmektedir. Şelat ajanlarının söz konusu bu ürünlere bahçedeyken uygulanması durumunda küf gelişimi ve toksin oluşumu hasat sırasında önlenebilir. Bu durumda, şelat ajanının meyveye uygulanma şekli oldukça önemlidir. Uygulanacak ajanın meyve içerisine en iyi şekilde penetre olması sağlanmalıdır. Ayrıca *in vivo* koşullarda yürütülecek bir çalışmada şelat ajanlarının meyve kalitesi

üzerinde yaratabileceği muhtemel etkileri de (meyvenin sertliği, pH'sı, büyüklüğü vb.) sonraki çalışmalarda detaylı bir şekilde incelenmelidir.

5. KAYNAKLAR

Abelson, P. H. and Aldous, E., "Ion Antagonisms in Microorganisms: Interference of Normal Magnesium Metabolism by Nickel, Cobalt, Cadmium, Zinc and Manganese", *Journal of Bacteriology*, 60 (4), 401-413, (1950).

Abrunhosa, L. and Venãncio, A., "*In vitro* Antifungal Effect of EDTA Disodium Salt in Tested Black Aspergilli", *Asian Journal of Biochemistry*, 3 (3), 176-181, (2008).

Abu-Mejdad, N. M. J. A., "Response of Some Fungal Species to The Effect of Copper, Magnesium and Zinc Under The Laboratory Condition", *European Journal of Experimental Biology*, 3 (2), 535-540, (2013).

Akbas, M. and Cag, S., "Use of Organic Acids for Prevention and Removal of *Bacillus subtilis* Biofilms on Food Contact Surfaces", *Food Science and Technology International*" 22 (7), 587-597, (2016).

Anonim, "Guidance Document for Competent Authorities for the Control of Compliance with European Commission Legislation on Aflatoxins", (2010).

Anonim, "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği", *28157 Sayılı Resmi Gazete*, (2011).

Anonim, "Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği ", *28693 Sayılı Resmi Gazete*, (2013).

Anonim, "2016 Yılı Kuru İncir Raporu", *T.C Gümrük ve Ticaret Bakanlığı*, (2017).

Anonim, "Czapek-dox agar (Merck 105460)", (9 Mayıs) http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020133.pdf, (2018).

Arslan, N. ve Aşan, T., "Şeker Pancarı Küspesinden Pektin İzolasyonu", *Gıda*, 18 (2), 117-120, (1993).

Arslan, G., "Gıda Katkı Maddeleri ve Yeni Yapılan Dioksimlerin Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılabilirliliğinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Konya, (2011).

Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H. and Serghini, M. A., "Effects of Organic Acids and Salts on the Development of *Penicillium italicum*: The Causal Agent of Citrus Blue Mold", *Plant Pathology Journal*, 10 (3), 99-107, (2011).

Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E. H. and Aoumar A. A. B., "Use of Food Additives to Control Postharvest Citrus Blue Mold Disease", *Atlas Journal of Biology*, 2 (2), 147-153, (2013).

Aşkın, O. ve Köşker, Ö., "İncirlerde Aflatoksin Teşekkülü Üzerinde Araştırmalar", *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, Diploma Sonrası Yüksekokul İhtisas Tez Özetleri, 1, 226-246, (1976).

Aziz, N. H. and Moussa, A. E., "Influence of White Light, Near UV Irradiation and Other Enviromental Conditions on Production of Aflatoxin B_1 by *Aspergillus flavus* and Ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*", *Molucular Nutrition Food Research*, 41 (3), 150-154, (1997).

Badii, F., Moss, M. O. and Wilson, K., "The Effect of Sodium Biselenite on The Growth and Aflatoxin Production *Aspergillus parasiticus* and the Growth of Other *Aspergilli*", *Letters in Applied Microbiology*, 2, 61-64, (1986).

Bakırcı, G., "Tahıl ve Tahıl Ürünlerinin Aflatoksin, Okratoksin A, Zearalenon, Fumonisin ve Deoksinivalenol Mikotoksinleri Yönünden İncelenmesi", *Akademik Gıda*, 12 (2), 46-56, (2014).

Bari, M. L., Ukuku, D. O., Kawasaki, Y., Inatsu, K., Isshiki and Kawamoto, S., "Combined Efficacy of Nisin and Pediocin with Sodium Lactate, Citric Acid, Phytic Acid, and Potassium Sorbate and EDTA in Reducing the *Listeria monocytogenes* Population of Inoculated Fresh-Cut Produce", *Journal of Food Protection*, 68 (7), 1381-1387, (2005).

Basaran, P., "Antifungal Effect of Acids and Surface Active Compounds for Post-Harvest Control of *Aspergillus parasiticus* Growth on Hazelnut", *Journal of Food Processing and Preservation*, 35, 236-246, (2011).

Battisti, R., Fronzab, N., Júniorb, Á. V., Silveirab, S. M., Damasa, M. S. P. and Quadria, M. G. N., "Gelatin-Coated Paper with Antimicrobial and Antioxidant Effect for Beef Packaging", *Food Packaging and Shelf Life*, 11, 115-124, (2017).

Boudra H., Le Bars J., Le Bars P. and Dupuy J., "Time of *Aspergillus flavus* Infection and Aflatoxin Formation in Ripening of Figs", *Mycopathologia*, 127 (1), 29-33, (1994).

Buchanan, J. R., Sommer, N. F. and Fortlage, R. J., "*Aspergillus flavus* Infection and Aflatoxin Production in Fig Fruits", *Applied Microiıology*, 30 (2), 238-241, (1975).

Casalinuova, I. A., Sorge, R., Bonelli, G. and DI Francesco P., "Evaluation of the Antifungal Effect of EDTA, a Metal Chelator Agent, on *Candida albicans* Biofilm", *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21, 1413-1420, (2017).

Chai, C., Lee, S., Kim, J. and Oh, S. W., "Use of Organic Acids for Prevention and Removal of *Bacillus subtilis* Biofilms on Food Contact Surfaces", *Journal of Food Safety*, 36 (3), 360-366, (2016).

Chambers, J. A. A., "Buffers, Chelating Agents and Denaturants", (eds: J. A. A. Chambers and D. Rickwood), "*Biochemistry LabFax*", United Kingdom: Bios Scientific Publishers, 1-36, (1993).

Chourasia, H. K., "Growth, Sclerotia and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*: Influence of Food Preservatives", *Letters in Applied Microbiology*, 17 (5), 204-207, (1993).

Coşkun, F., "Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular", *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 27-32, (2006).

Cotty, P. J., "Comparison of Four Media for the Isolation of *Aspergillus flavus* Group Fungi", *Mycopathologia*, 125 (3), 157-162, (1994).

Cuero, R., Ouellet, T., Yu, J. and Mogongwa, N., "Metal Ion Enhancement of Fungal Growth, Gene Expression and Aflatoxin Synthesis in *Aspergillus flavus*: RT-PCR Characterization", *Journal of Applied Microbiology*, 94, 953-961, (2003).

Çakar, N. E., "*Aspergillus niger* HBF39' dan Lipaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı*, Aydın, (2016).

Çalışkan, O. ve Polat, A. A., "Bazı İncir Çeşitlerinin Fitokimyasal ve Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi", *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 49 (2), 201-207, (2012).

Davis, N. D., Diener, U. L. and Anihotri, V. P., "Production of Aflatoxin B_1 and G_1 in Chemically Defined Medium", *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 31, 251-256, (1967).

Dayi, C., Ling, X. and Rong, Y., "Phytic Acid Inhibits The Production of Aflatoxin B_1", *Journal of Food Processing and Preservation*, 19 (1), 27-32, (1995).

De Lucca, A. J., "*In vitro* Inhibitory and Fungicidal Properties of EDTA for *Aspergillus* and *Fusarium* Species", *Proceeding of Interscience Conferance on Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, San Francisco, 27-30, (2016).

Demir, S. T., Özar, A. İ., Gülseri, O., Çoksöyler, N., Konca R., Aksoy, U., Düzbastılar, M. ve Sağdemir A., "Ege Bölgesinde İncirlerde Görülen Aflatoksin ve Okratoksin Oluşumu ile Önlenmesine Üzerinde Araştırmalar" *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı*, Proje No: KKGA-B-03-F-052, Proje Nihai Raporu, (1990).

Diener, U. L. and Davis, N. D., "Aflatoxin Formation in Peanuts by *Aspergillus flavus*", *Agriculturel Experiment Station*, Auburn University, Auburn, (1977).

D'Souza, D. H. and Brackett, R. E., "The Influence of Divalent Cations and Chelators on Aflatoxin B_1 Degradation by *Flavobacterium aurantiacum*", *Journal of Food Protection*, 63 (1), 102-105, (2000).

D'Souza, D. H. and Brackett, R. E., "Aflatoxin B_1 Degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the Presence of Reducing Conditions and Seryl and Sulfhydryl Group Inhibitors", *Journal of Food Protection*, 64 (2), 268-271, (2001).

Doležalová, M., Molatová, Z., Březina, P. and Marounek, M., "Effect of Organic Acids on Growth of Chilled Chicken Skin Microflora", *Journal of Food Safety*, 30, 353-365, (2010).

Doster, M. A. and Michailides, T. J, "Susceptibility of Maturing Calimyrna Figs to Decay by Aflatoxin-Producing Fungi in California", *First International Symposium on Fig*, İzmir, 187-191, (1997).

Ehrlich, K. and Ciegler, A., "Effect of Phytate on Aflatoxin Formation by *Aspergillus parasiticus* Grown on Different Grains", *Mycopathologia*, 92 (1), 3-6, (1985).

Ehrlich, K. C. and Cotty, P. J., "Variability in Nitrogen Regulation of Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* strains", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 174-178, (2002).

Ehrlich, K. C., Kobbeman, K., Montalbano, B. G. and Cotty, P. J., "Aflatoxin-Producing Aspergillus Species from Thailand", *International Journal of Food Microbiology*, 114, 153-159, (2007).

Ellis, W. O., Smith, J. P. Simpson, B. K., Ramaswamy, H. and Doyon, G., "Growth of and Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* in Peanuts Stored Under Modified Atmosphere Packaging (MAP) Conditions", *International Journal Food Microbiology*", 22 (2-3), 173-187, (1994).

El-Sharkawy, E. E. S., Abdalla, M. Y. and El-Shemy, A. O., "Effect of Some Resistance Chemical Inducers on Incidence of Cucumber Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp *cucumerinum*", *EgyptİanJournal of Biological Pest Control*, 26 (1), 1-6, (2016).

Erkan, K., "Mikrobiyal Fitaz Üretimine ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, *Biyoloji Anabilim Dalı*, Ankara, (2014).

Fakruddin, M., Chowdhury, A., Hossain, M. N. and Ahmed, M. M., "Characterization of Aflatoxin Producing *Aspergillus flavus* from Food and Feed Samples", *SpringerPlus*, 4 (159), 2-6, (2015).

FDA, "BAM Media M127: Potato Dextrose Agar", (20 October), https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm063519.htm, (2001).

FDA, "Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000381 [online]", (20 August 2017), https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm313045.htm, (2012).

FDA, "Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000573 [online]", (28 August 2017), https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm469216.htm, (2015).

FDA, "CFR - Code of Federal Regulations Title 21 [online]", (28 August 2017), https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1033, (2017).

Firestone, M. K. and Davidson, E. A., "Microbiological Basis of NO and NO_2 Production and Consumption in Soil", (eds: M. O. Andreae, D. S. Schimel

and G. P. Robertson), *Exchange of Trace Gases Between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere*, Dahlem: John Wiley & Sons, 7-21, (1989).

Fratamico, P. M, Bhunisa, A. K. and Smith, J. L., *Foodborne Pathogens Microbiology and Moleculer Biology*, United Kingdom: Caister Academic Press, 164-173, (2005).

Gautam, A. K. and Bhadauria, R., "Characterization of *Aspergillus* Species Associated with Commercially Stored Triphala Powder", *African Journal of Biotechnology*, 11, 16814-16823, (2012).

Gourama, H. ve Bullerman, L. B., "*Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feeds: A Review", *Journal of Food Protection*, 58 (12), 1395-1404, (1995).

Gowda, N. K. S, Malathi, V. and Suganthi, R. U., " Effect of Some Chemical and Herbal Compounds on Growth of *Aspergillus parasiticus* and Aflatoxin Production", *Animal Feed Science and Technology*, 116 (3-4), 281-291, (2004).

Guo, B., Chen, Z. Y., Lee, R. D. and Scully, B. T., "Drought Stress and Preharvest Aflatoxin Contamination in Agricultural Commodity: Genetics, Genomics and Proteomics", *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (10), 1281-1291, (2008).

Gupta, S. K. and Venkitasubramanian, A., "Production of Aflatoxin on Soybeans", *Applied Microbiology*, 29 (6), 834-836, (1975).

Gümüş, T. ve Yılmaz, İ., "Mikotoksinlerin Sağlık Üzerine Etkisi", *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, 293-296, (2006).

Gür, E. ve Demirağ, K., Şelat Ajanları (editör: T. Altuğ), *Gıda Katkı Maddeleri*, İzmir: Sidaş Yayıncılık, 193-199, (2009).

Hamed, N. S., Murad, A. F. and Abdul-Rahim, E. A., "Molecularly Diagnostic of Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* Isolated from Nuts", *Research Journal of Environmental Toxicology*, 10 (1), 39-49, (2016).

Hensarling, T. P., Jacks, T. J., Lee, L. S. and Ciegler, A., "Production of Aflatoxins on Soybean and Cottonseed Meals", *Mycopathologia*, 83 (2), 125-127, (1983).

Heperkan, D., "Mikotoksinlerin Biyolojik Yöntemler ve Kimyasal Bağlayıcılarla Uzaklaştırılmasındaki Güncel Gelişmeler", *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, 105-108, (2006).

Holmes, R. A., Boston, R. S. and Payne, G. A., "Diverse Inhibitors of Aflatoxin Biosynthesis", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78 (4), 559-572, (2008).

Holmquist, G. U., Walker, H. W. and Stahr, H. M., "Influence of Temperature, pH, Water Activity and Antifungal Agents on Growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*", *Journal of Food Science*, 48 (3), 778-782, (1983).

Hua, Z., Song, R., Du, G., Li, H. and Chen J., "Effects of EDTA and Tween60 on Biodegradation of N-Hexadecane with Two Strains of *Pseudomonas aeruginosa*", *Biochemical Engineering Journal*, 36, 66–71, (2007).

Ikechi-Nwogu, C. G. and Elenwo, E. N., "Comparing the Growth of Fungal Cultures on Groundnut Dextrose Medium and Potatoes Dextrose Medium", *Journal of Science*, 1 (3), 46-54, (2012).

İşman, B., "Aydın Yöresinde Yetiştirilen Kuru İncirlerdeki Fungus Florasına Ultraviyole Işınlarının Etkilerinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, *Biyoloji Anabilim Dalı*, Aydın, (2004).

Jackson, M. J., Slininger, P. J. and Bothast, R. J., "Effect of Zinc, Iron, Cobalt, and Manganese on *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 Growth and Fusarin C Biosynthesis in Submerged Cultures", *Applied and Enviromental*, 55, 649-655, (1989).

JECFA, "Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants", *Sixty-eight report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, 1-224, (2007).

Joshi, S., Sanjay, Y., Nerurkar, A. and Desai, A. J., "Statistical Optimization of Medium Components for the Production of Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17 (2), 313-319, (2007).

Kaba, N. ve Duyar, H. A., "*Antimikrobiyal Paketleme*", *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 25 (2), 181-185, (2008).

Kabak, B. ve Var, I., "Işınlamanın Küf Gelişimi ve Mikotoksin Kontrolü Üzerine Etkisi", *Gıda*, 30 (1), 197-201, (2005).

Kachholz, T. and Demain, A. L.," Nitrate Repression of Averufin and Aflatoxin Biosynthesis", *Journal of Natural Products*, 46 (4), 499-506, (1983).

Karaca H., "Kuru İncirlerin Aflatoksin, Patulin, Ergosterol İçeriği ve Farklı Koşullarda Aflatoksinlerin Parçalanma Düzeyleri", Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, Denizli, (2005).

Karaca, H. ve Yemiş, O., "Mikotoksin Kontaminasyonu: Zeytin ve Ürünlerinde Toksin Riski", *I. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi*, Balıkesir, 174-182, (2008).

Karaca H., Pérez-Gago, M. B., Taberner, V. and Palou, L., " Evaluating Food Additives as Antifungal Agents against *Monilinia fructicola in vitro* and in Hydroxypropyl Methylcellulose–Lipid Composite Edible Coatings for Plums", *International Journal of Food Microbiology*, 179, 72-74, (2014).

Karadoğan, T. ve Özer, H., "Patatesin Besin Değeri ve İnsan Beslenmesi Yönünden Önemi", *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28 (2), 306-317, (1997).

Kim, S. A. and Rhee, M. S., "Synergistic Antimicrobial Activity of Caprylic Acid in Combination with Citric Acid against both *Escherichia coli* O157:H7 and İndigenous Microflora in Carrot Juice", *Food Microbiology*, 49, 166-172, (2015).

Kim, S. W., Park, J. K., Lee, C. H., Hahn, B. S. and Koo, J. C., "Comparison of the Antimicrobial Properties of Chitosan Oligosaccharides (COS) and EDTA against *Fusarium fujikuroi* Causing Rice Bakanae Disease", *Current Microbiology*, 72 (4), 496-502, (2016).

Kim, N. H. and Rhee, M. S., "Phytic Acid and Sodium Chloride Show Marked Synergistic Bactericidal Effects against Nonadapted and Acid-Adapted *Escherichia coli* O157:H7 Strains", *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (4), 1040-1049, (2016).

Koehler, P. E., Hanlin, R. T. and Beraha, L., "Production of Aflatoxins B_1 and G_1 by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* Isolated from Market Pecans", *Applied Microbiology*, 30 (4), 581-583, (1975).

Kranthi, V. S., Rao, D. M. and Jaganmohan, P., "Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes", *International Journal of Microbiological Research*, 3 (1), 12-15, (2012).

Kumar, V., Sinha, A. K., Harinder, P. S. and Becker, K., "Dietary Roles of Phytate and Phytase in Human Nutrition: A review", *Food Chemistry*, 120, 945–959, (2010).

Lanigan, R. S. and Yamarik, T. A., "Final Report on the Safety Assessment of EDTA, Calcium Disodium EDTA, Diammonium EDTA, Dipotassium EDTA, Disodium EDTA, TEA-EDTA, Tetrasodium EDTA, Tripotassium EDTA, Trisodium EDTA, HEDTA, and Trisodium HEDTA", *International Journal of Toxicology*", 21 (2), 95-142, (2002).

Lazar, E. E., Wills, R. B. H., Ho, B. T., Harris, A. M. and Spohr, L. J., "Antifungal Effect of Gaseous Nitric oxide on Mycelium Growth, Sporulation and Spore Germination of the Postharvest Horticulture Pathogens, *Aspergillus niger*, *Monilinia fructicola* and *Penicillium italicum*", *Letters in Applied Microbiology*, 46, 688-692, (2008).

Lee, J., Her, J. Y. and Lee, K. G., "Reduction of Aflatoxins (B_1, B_2, G_1, and G_2) in Soybean-Based Model Systems", *Food Chemistry*, 189, 45-51, (2015).

López-Malo, A., Alzamora, S. M. and Argaiz, A., "Effect of Natural Vanillin on Germination Time and Radial Growth of Moulds in Fruit-Based Agar Systems", *Food Microbiology*, 12, 213-219, (1995).

Maas, P., Sandt, T., Klapwijk, B. and Lens, P., "Biological Reduction of Nitric Oxide in Aqueous Fe(II)EDTA Solutions", *Biotechnology Progress*, 19, 1323-1328, (2003).

Maggon, K. K., Gopal, S. and Venkita Subramanian, T. A., "Effect of Trace Metals on Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus*", *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 164, 523-530, (1973).

Mahunu, G. K., Zhang H., Yang Q., Zhang, X., Li D. and Zhou, Y., "Improving the Biocontrol Efficacy of *Pichia caribbica* with Phytic Acid against Postharvest Blue mold and Natural Decay in Apples", *Biological Control*, 92, 172-180, (2016).

Marsh, P. B., Simpson, M. E. and Trucksess, M. W., "Effects of Trace Metals on the Production of Aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*", *Applied Microbiology*, 30 (1): 52-57, (1975).

McAlpin, C. E. and Wicklow, D. T., "Culture Media and Sources of Nitrogen Promoting the Formation of Stromata and Ascocarps in Petromyces Alliaceus (*Aspergillus* section *Flavi*), "*Canadian Journal of Microbiology*", 51 (9), 765-771, (2005).

Mehl, H. L. and Cotty, P. J., "Nutrient Environments Influence Competition among *Aspergillus flavus* Genotypes", *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (5), 1473-1480, (2013).

Mendez-Albores, A., Arámbula-Villa, G., Loarca-Piña, M. G. F., Castaño-Tostado, E. and Moreno-Martínez, E., "Safety and Efficacy Evaluation of Aqueous Citric Acid to Degrade B-Aflatoxins in Maize", *Food and Chemical Toxicology*, 43 (2), 233-238, (2005).

Mendez-Albores A., Del Río-García, J. C. and Moreno-Martínez, E., "Decontamination of Aflatoxin Duckling Feed with Aqueous Citric Acid Treatment", *Animal Feed Science and Technology*, 135 (3-4), 249-262, (2007).

Mendez-Albores, A., Veles-Medina, J., Urbina-Álvaraz, E., Martínez-Bustos, F. and Moreno-Martínez, E., "Effect of Citric acid on Aflatoxin Degradation and on Functional and Textural Properties of Extruded Sorghum", *Animal Feed Science and Technology*, 150 (3-4), 316-329, (2009).

Morton, S. G., Eadie, T. and Llewellyn, G. C., "Aflatoxigenic Potential of Dried Figs, Apricots, Pineapple, and Raisins", *Association of Official Analytical Chemists*, 62 (4), 958-962, (1979).

Nauta, T., "Chelating Agents", (ed: J. Smith), *Food Additive User's Handbook*, New York: AVI Publishers, 273-279, (1991).

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

Oh, M., Lee, J., Jeong, Y. and Kim, M., "Synergistic Antilisterial Effects of Mixtures of Lysozyme and Organic Acids", *Journal of Food Protection*, 79 (12), 2184-2189, (2016).

Ogundero, V. W., "Temperature and Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* Strains from Nigerian Groundnuts*", Journal of Basic Microbiology*", 27 (9), 511-514, (1987).

Ozcakmak, S., Dervisoglu, S., Pembeci-Kodolbas, C. and Sagdic, O., "Effects of Thyme and Rosemary Essential Oils on the Growth of Two Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* Strains", *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83, 170-174, (2010).

Özcan, M., "Inhibitory Effects of Spice Extracts on the Growth of *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999 Strain", *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 207, 253-255, (1998).

Özer, H., "Fındıklara Uygulanan Fiziksel ve Isıl Süreçlerin Aflatoksinler Üzerine Etkisi", Doktora Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, İstanbul, (2009).

Özkaya, Ş. ve Temiz, A., "Aflatoksinler : Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri ve Detoksifikasyonları", *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1 (1), 1-21, (2003).

Özpala, A., "Aydın Yöresi Kuru İncirlerinde Aflatoksin Tayini ve Yöntemlerin Karşılaştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Aydın, (2006).

Özyaral, O., Keskin, Y., Başkaya, R, Lüleci, E. ve Gülen, D., "Şeker ve Şeker Katkılı Besin Maddelerinde Kserofilik-Kserotoleran küfler", *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti*, 37 (1), 43-50, (2007).

Payne, G. A. and Hagler, W. M. JR., "Effect of Specific Amino Acids on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in Defined Media", *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (4), 805-812, (1983).

Pitt, J. I. and Hocking, A. D., *Fungi and Food Spoilage*, Sydney: Springer-Science+Business media publisher, 3-12, (1997).

RASFF, "Rapid Alert System for Food and Feed", *Annual Report on Functioning of the RASFF*, EU Report, EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, (2012).

RASFF, "Rapid Alert System for Food and Feed", *Annual Report on Functioning of the RASFF*, EU Report, EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, (2013).

RASFF, "Rapid Alert System for Food and Feed", *Annual Report on Functioning of the RASFF*, EU Report, EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, (2014).

RASFF, “Rapid Alert System for Food and Feed”, *Annual Report on Functioning of the RASFF*, EU Report, EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, (2015).

RASFF, “Rapid Alert System for Food and Feed”, *Annual Report on Functioning of the RASFF*, EU Report, EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General (2016).

Rastegar, H., Shoeibi, S., Yazdanpanah, H., Amirahmadi, M., Khaneghah, A. M., Campagnollo, F. B. and Sant’Ana, A. S., “Removal of Aflatoxin B_1 by Roasting with Lemon Juice and/or Citric Acid in Contaminated Pistachio Nuts”, *Food Control*, 71, 279-284, (2017).

Razavi-rohani, S. M. and Griffiths, M. W., “Antifungal Effects of Sorbic Acid and Propionic Acid at Different pH and NaCl Conditions”, *Journal of Food Safety*, 19, 109-120, (1999).

Reddy, T. V., Viswanathan, L. and Venkitasubramanian, T. A., “Factors Affecting Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* in a Chemically Defined Medium”, *Journal of General Microbiology*, 114, 409-413, (1979).

Reiss, J., “Prevention of the Formation of Mycotoxins in Whole Wheat Bread by Citric Acid and Lactic Acid (Mycotoxins in Foodstuffs. IX)”, *Experientia*, 32 (2), 168-169, (1976).

Renard, M. G. C. and Thibault, J. F., “Structure and Properties of Apple and Sugar-Beet Pectins Extracted by Chelating Agents”, *Carbohydrate Research*, 224 (1), 99-114, (1993).

Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N., “*Aspergillus* section *Flavi* and Aflatoxins in Algerian Wheat and derived Products”, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2772-2777, (2010).

Ruhil, S., Balhara, M., Dhankhar, S., Kumar, M., Kumar, V. and Chhillar, A. K., “Advancement in Infection Control of Opportunistic Pathogen (*Aspergillus* Spp.): Adjunctive Agents”, *Current Pharmaceutical Biotechnology*”, 14 (2), 226-232, (2013).

Ruhil, S., Kumar, V., Balhara M., Malik, M., Dhankhar, S., Kumar M. and Chhillar A. K., “*In Vitro* Evaluation of Combination of Polyenes with EDTA against *Aspergillus* spp. by Different Methods (FICI and CI Model)”, *Journal of Applied Microbiology*, 117, 643-653, (2014).

Safara, M., Zaini, F., Hashemi S. J., Mahmoudi, M., Khosravi A. R. and Shojai-Aliabadi, F., "Aflatoxin Detoxification in Rice using Citric Acid", *Iranian Journal of Public Health*, 39 (2), 24-29, (2010).

Schindler, A. F., Palmer, J. G. and Eisenberg, W. V., "Aflatoxin Production by *Aspergillus favus* as Related to Various Temperatures", *Applied Microbiology*, 15 (5), 1006-1009, (1967).

Schmidt-Heydt, M., Magan, N. and Geisen, R., "Stress Induction of Mycotoxin Biosynthesis Genes by Abiotic Factors", *FEMS Microbiol Letters*, 284, 142-149, (2008).

Schroeder, H. W. and Hein, H. JR., "Aflatoxins: Production of the Toxins *In Vitro* in Relation to Temperature[1]", *Applied Microbiology*, 15 (2), 441-445, (1967).

Schultz, J. and Muller W., "Effects of Organic Acids on Mould Growth in Feed Containing Meat", *Tieraerztliche Umschau*, 54 (2), 98-101, (1999).

Seçkin, G. ve Taşeri, L., "Yarı-Kurutulmuş Meyve Sebzeler", *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 21 (9), 414-420, (2015).

Sen, B. H., Akdeniz, B. G. and Denizci, A. A., "The Effect of Ethylenediamine-tetraacetic Acid on *Candida albicans*", *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 90 (5), 651-655, (2000).

Sezek, F., Doğan, S., Bal, D. A., Örtücü, S. ve Dönel, G., "Bazı Yalancıakreplerden (Arachnida: Pseudoscorpionida) İzole Edilen Mikrofunguslar", *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1 (2), 211-221, (2008).

Shahin, A. A. and Aziz, N. H., "Influence of Gamma Rays and Sodium Chloride on Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus*", *Microbios*, 90 (364-365), 163-175, (1997).

Sheftel, V. O., *Handbook of Toxic Properties of Monomers and Additives*, United State of America: Lewis Publishers, 193-228, (1995).

Shokri, H., "Evaluation of Inhibitory Effects of Citric and Tartaric Acids and Their Combination on the Growth of *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, and *Malassezia furfur*", *Comparative Clinical Pathology*, 20 (5), 543-545, (2011).

Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D. and Sorenson, W. G., "Production of Aflatoxin on Rice", *Applied Microbiology*, 14 (3), 425-428, (1996).

Silva, L. C. A. S., Harder, M. N. C., Arthur, P. B., Lima, R. B., Modolo, D. B. and Arthur, V., "Physical-chemical Characterısıtıcs of Figs (*Ficus carica*) Preready to Submitted to Ionizing Radiation", *2009 International Nuclear Atlantic Conference*, Rio de Janeiro, Brazil, (2009).

Singh, R. and Mandal, A. B., "Efficacy of Fumaric and Citric acids in Preventing Biosynthesis of Aflatoxins in Poultry Feed with Variable Moisture Content", *Indian Journal of Animal Sciences*", 84 (4), 453-456, (2014).

Soyal, S., "*Aspergillus tubingensis* Tarafından Üretilen Fitaz Enziminin Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı*, Aydın, (2014).

Stanojevic, D., Comic, L., Stefanovic, O. and Solujic-Sukdolak, S., "Antimicrobial Effects of Sodium Benzoate, Sodium Nitrite and Potassium Sorbate and Their Synergistic Action *in Vitro*", *Bulgarian Journal of Agricultural Science*", 15 (4), 307-311, (2009).

Stiles, J., Penkar, S., Plocková, M., Chumchalová, J. and Bullerman, L. B., " Antifungal Activity of Sodium Acetate and *Lactobacillus rhamnosus*", *Journal of Food Protection*, 65 (7), 1188-1191, (2002).

Stone, R. W. and Farrell, M. A., "Synthetic Media for Penicillin Production", *Science*, 104 (2706), 445-446, (1946).

Stroka, J., Anklam, E., Jörissen, U. and Gilbert J., "Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder: Collaborative Study, *Journal of AOAC International*, 83 (2), 320-340, (2000).

Şahin, İ. ve Korukluoğlu, M., *Küf-Gıda-İnsan*, Bursa: Vipaş Yayınları, 8-20, (2000).

Şat, İ. G. ve Keleş, F., "Fitik asit ve Beslenmeye Etkisi", *Gıda*, 29, 405-409, (2004).

Şen, L. ve Nas, S., "Kuru İncir, Üzüm ve Kırmızıbiberlerde Mikotoksin Varlığı", *Akademik Gıda*, 8 (3), 24-32, (2010).

Şimsek, A. ve Kılıç, B., "Et Ürünlerinde Kullanılan Fosfatların Antioksidan ve Antimikrobiyal Özellikleri", *Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5 (4), 299-307, (2017).

Tiwari, R. P, Mittal, V., Bhalla, T. C., Saini, S. S., Singh, G. and Vadehra, D. V., "Effect of Metal Ions on Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*", *Folia Microbiologica*, 31 (2): 124-128, (1986).

Turhan, Ö., "Küflü Sucuklarda Mikrofloranın Belirlenmesi ve Küf Gelişmesi Üzerine Maya İzolatlarının Etkisinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, İstanbul, (2010).

Türkkan, M. and Erper, İ., "Inhibitory Influence of Organic and Inorganic Sodium Salts and Synthetic Fungicides Against Bean Root Rot Pathogens", *Gesunde Pflanzen*, 67 (2), 83-94, (2015).

Uraih, N. and Chipley, J. R., "Effects of Various Acids and Salts on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* NRLL 3145", *Microbios*, 17 (67), 51-59, (1976).

Van Buren, J. P., "Function of Pectin in Plant Tissue Structure and Firmness", (ed: R. H. Walter), *The Chemistry and Technology of Pectin*, California: Academic Press, 1-22, (1991).

Wang, B., Han, X., Bai, Y., Lin, Z., Qui, M., Nie, X., Wang, S., Zhang, F., Zhuang, Z., Yuan, J. and Wang, S., "Effects of Nitrogen Metabolism on Growth and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus flavus*", *Journal of Hazardous Materials*, 15 (324), 691-700, (2017).

WHO, "Diquat in Drinking-Water-Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality" *World Health Organization*, Geneva, (2003).

Wildman, J. D., Stoloff, L. and Jacobs, R., "Aflatoxin Production by a Potent *Aspergiilus flavus* Link Isolate", *Biotechnology and Bioengineering*, 9, 429-437, (1967).

Wreesmann, C. T. J., "Reasons for Raising the Maximum Acceptable Daily Intake of EDTA and the Benefits for Iron Fortification of Foods for Children 6–24 months of age", *Maternal and Child Nutrition*, 10, 481-495, (2014).

Wu, H. S., Chen, X. Q., Yang, X. N., Liu, Y. D. and Zhao, G. M., "*In Vitro* Growth of *Fusarium oxysporum* f. sp *niveum* in Chemically Defined Citric Acid", *Asia Life Sciences,* 20 (1), 63-75, (2011).

Wu, Z., Wu, J., Peng, T., Li, Y., Lin, D., Xing, B., Li, C., Yang, Y., Yang, L., Zhang, L., Ma, R., Wu, W., Lv, X., Dai, J. and Han, G., "Preparation and Application of Starch/Polyvinyl Alcohol/Citric Acid Ternary Blend Antimicrobial Functional Food Packaging Films", *Polymers,* 9 (102), 1-19, (2017).

Yang, Q., Zhang, H., Zhang, X., Zheng, X. and Qian, J., "Phytic Acid Enhances Biocontrol Activity of *Rhodotorula mucilaginosa* against *Penicillium expansum* Contamination and Patulin Production in Apples", *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-9, (2015).
Yentür, G. ve Er, B., "Gıdalarda Aflaroksin Varlığının Değerlendirilmesi", *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69 (1), 41-52, (2012).

Yıkılmaz, F., "Tekirdağ İlinde Satışa Sunulan Kuru İncirlerde Aflatoksin Varlığı", Yüksek Lisans Tezi, *Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, Tekirdağ, (2007).

Yılmaz, F, Ergene, A. ve Yalçın, E., "Süt Fabrikası Atıksuyundan İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosürfektan Üretimi: Optimum Koşullarının Araştırılması", *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi,* 8 (1), 20-30, (2010).

Yiğit, S., "Çeşitli Dezenfektanların Atom Marulun Mikrobiyolojik Kalitesi Üzerine Etkisi", Yüksek Lisans Tezi, *Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, Tekirdağ, (2008).

Zeringue, H. J., Shih, B. Y., Maskos, K. and Grimm, D., "Identification of the Bright-Greenish-Yellow-Fluorescence (BGY-F) Compound on cotton Lint Associated with Aflatoxin Contamination in Cottonseed", *Phytochemistry,* 52, 1391-1397, (1999).

Zhang, H., Yang, Q., Lin, H., Ren, X. Zhau, L. and Hou, J., "Phytic Acid Enhances Biocontrol Efficacy of *Rhodotorula mucilaginosa* against Postharvest Gray mold Spoilage and Natural Spoilage of Strawberries", *LWT - Food Science and Technology,* 52 (2), 110-115, (2013).

Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., Li, J., Ren, Y. and Yan, W., "Synergistic Effect of Thymol and Carvacrol Combined with Chelators and Organic Acids against *Salmonella Typhimurium*", *Journal of Food Protection,* 70 (7), 1704-1709, (2007).

Zohri, A. A., Saber, S. M. and Mostafa, M. E., "Effect of Selenite and Tellurite on the Morphological Growth and Toxin Production of *Aspergillus parasiticus* var. *glabus* IMI 120920", *Mycopathologia*, 139 (1), 51-57, (1997).

Zorlugenç, B., "Çeşitli Gıda Maddelerinden *Flavobacterium aurantiacum* ile Aflatoksin B_1 Miktarının Azaltılması Üzerine Bir Araştırma", Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, *Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, Adana, (2009).

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	:	Şule GÜNAYDIN
Doğum Yeri ve Tarihi	:	Aydın/16.10.1991
Lisans Üniversite	:	Pamukkale Üniversitesi
Elektronik posta	:	sulegunaydin@hotmail.com
İletişim Adresi	:	Şemikler Mah. 3001 Sk No:3 Daire:28

Yayın Listesi :

• Gunaydin, S., Karaca, H., Palou, L., Fuente, B. and Pérez-Gago, M. B., "Effect of Hydroxypropyl Methylcellulose-Beeswax Composite Edible Coatings Formulated with or without Antifungal Agents on Physicochemical Properties of Plums during Cold Storage", *Journal of Food Quality*, 2017, 1-9, (2017).

• Günaydın, Ş. ve Karaca, H., "Küf Gelisimi ve Mikotoksin Olusumunun Kontrolünde Doğal Bitki Ekstraktlarının Kullanımı", *Akademik Gıda*, 13 (2), 71-80, (2015).

• Günaydın, Ş. ve Karaca, H., "Deli Bal Zehirlenmesi", *Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi*, 1-5 Kasım, Muğla, (2016).

• Günaydın, Ş. ve Karaca, H., "Fındıkta Aflatoksin Sorunu", *Pamukkale Gıda Sempozyumu III, Kurutulmuş ve Yarı kurutulmuş Gıdalar*, 13-15 Mayıs, Denizli, (2015).

• Günaydın, Ş. ve Karaca, H., "Mineral Maddelerin Küf Gelişimi ve Mikotoksin Oluşumu Üzerine Etkisi", *2. İç Anadolu Bölgesi Tarım ve Gıda Kongresi*, 28-30 Nisan, Nevşehir, (2015).