

149596

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SECTION *NIGRI*'YE AİT BAZI
POTANSİYEL OKRATOKSİJENİK
ASPERGILLUS TÜRLERİNİN
OKRATOKSİN-A ÜRETİMLERİNİN
İNCELENMESİ**

Tuba Ayla EŞDER
Biyoloji Bölümü
Bilim Dalı Kodu: 401.01.04
Sunuş Tarihi: 06 Ekim 2004

Tez Danışmanı: Yard. Doç.Dr. Mustafa ATEŞ

Bornova - İZMİR

III

Tuba Ayla Eşder tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ tezi olarak sunulan **"Section Nigri'ye Ait Bazı Potansiyel Okratoksijenik Aspergillus türlerinin Okratoksin-A Üretimlerinin İncelenmesi"** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **06.10.2004** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı :Yard. Doç. Dr. Mustafa ATEŞ.

Raportör Üye : Prof. Dr. İsmail KARABOZ.....

Üye : Prof. Dr. Rengin ELTEM.....

İmza



ÖZET

**SECTION *NIGRI*'YE AIT BAZI POTANSİYEL
OKRATOKSİJENİK *ASPERGILLUS* TÜRLERİNİN
OKRATOKSİN-A ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ**

EŞDER, Tuba Ayla

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Yard. Doç. Dr. Mustafa ATEŞ

Ekim 2004, 81 sayfa

Bu çalışmada, Section *Nigri*'ye ait *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus aculatus* ve *Aspergillus tubingensis* türlerine ait toplam 14 suşun büyüme eğrileri çıkartılmıştır. Bu türlerin çok hızlı bir büyüme gösterip 4. günden sonra durgunluk fazına girdiği belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca, Section *Nigri*'ye ait toplam 6 türü içeren 47 suşun Okratoksin-A üretimleri Agar Plug yöntemine göre incelenmiş ve bunlardan 11 tanesinin minimum 4,38 ppb, maksimum 15,98 ppb düzeyinde Okratoksin-A ürettikleri saptanmıştır.

Çalışmalar sonucunda, *Aspergillus tubingensis* 298-T'nin gelişme ve toksin üretimine, 25 °C'de, 3 günlük inkübasyon sonunda pH'ı 5 olan, %15-20 sakkaroz içeren besiyerinin en etkili olduğu, bu değerlerin altında yada üstünde ise Okratoksin-A üretiminin azaldığı yada engellendiği saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Aspergillus tubingensis* 298-T, Okratoksin-A, Okratoksijenik küfler

VII

ABSTRACT

INVESTIGATION OF OCHRATOXIN-A PRODUCTIONS OF SOME POTENTIAL OCHRATOXIGENIC *ASPERGILLUS* SPECIES IN SECTION *NIGRI*

EŞDER, Tuba Ayla

Msc in Biology Department

Supervisor: Yard. Doç. Dr. Mustafa ATEŞ

October 2004, 81 pages

In this study; totally 14 strain growing-curves belonging to *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus aculatus* and *Aspergillus tubingensis* which belong to the Section *Nigri* were calculated. During this research; determined that these mentioned species grew very fast and after 4th day they got through stationary phase. Also, ochratoxin-A production of 47 strains including 6 species were investigated according to Agar Plug method and determined that 11 of them produced ochratoxin-A at min. 4,38 ppb, max. 15,98 ppb level.

As a result of the studies; the medium which is pH 5, including %15-20 sucrose at 25°C in 3 days incubation upon reproducing and toxin synthesis of *Aspergillus tubingensis* 298-T has been found the most effective, and the production of ochratoxin-A is restricted or blocked at below or above of these values according to the researches.

Keywords: *Aspergillus tubingensis* 298-T, ochratoxin-A, ochratoxigenic moulds

IX

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yapılmasını öneren ve alışmalarımda her trl desteğini grdğm, değerli bilgilerinden yararlandığım tez yneticim, Sayın Hocam Yard. Do. Dr. Mustafa ATEŞ'e, değerli katkılarında dolayı Sayın Hocam Prof. Dr.Rengin ELTEM'e, tezimin yazım aşamasında yardımcı olan Sayın Serkan BİLGİN'e ve her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

XI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIX
1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1 Okratoksin-A Üreticisi Küfler	4
2.2 Okratoksin-A'nın Kimyasal Yapısı	7
2.3 Okratoksin-A'nın Biyolojik Etkileri.....	9
2.4 Çeşitli Ürünlerde Okratoksin-A Varlığı	13
2.5 Tolere Edilebilir Alım Limitleri	23
2.6 Düzenleme	26

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.7 Okratoksijenik Küflerin Üremesine ve Okratoksin Sentezine Etki Eden Faktörler	26
2.8 Üreme ve Toksin Sentezinin Kontrolü.....	28
3.MATERYAL VE METOD	33
3.1 Materyal	33
3.1.1 Mikroorganizmalar.....	33
3.1.2 Besiyerleri	33
3.1.3 Standart okratoksin-A	34
3.1.4 HPLC mobil fazı	35
3.1.5 HPLC koşulları	35
3.2 Metod	35
3.2.1 Siyah Sporlu küflerin aktif hale getirilmesi ve saklanması.....	35
3.2.2 İnokulum hazırlanması.....	36
3.2.3 Büyüme eğrisinin çıkartılması	36
3.2.4 Potansiyel okratoksijenik küf türlerinin OT-A üretiminin incelenmesi ve ekstraksiyon metodu	36
3.2.5 OT-A ekstraksiyon metodunun geri kazanım yüzdesinin (%R) saptanması	38

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.6 <i>A. tubingensis</i> 298-T'nin OT-A üretimine zamanın etkisi.....	38
3.2.7 <i>A. tubingensis</i> 298-T'nin OT-A üretimine sıcaklığın etkisi.....	38
3.2.8 <i>A. tubingensis</i> 298-T'nin OT-A üretimine % sakkaroz içeriğinin etkisi	39
3.2.9 <i>A. tubingensis</i> 298-T'nin OT-A üretimine pH'nın etkisi.....	39
4.BULGULAR	40
4.1 Büyüme Eğrileri	40
4.2 Agar Plug Metodunun Geri Kazanım Yüzdesi (%R)	47
4.3 Siyah Sporlu Küflerin OT-A Üretimleri.....	47
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	52
6.ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR DİZİNİ	60
EKLER	76
ÖZGEÇMİŞ.....	81

XVII

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Okratoksin-A'nın kimyasal yapısı	9
4.1 <i>A. foetidus</i> 1K4-42'nin büyüme eğrisi	40
4.2 <i>A. foetidus</i> var. <i>pallidus</i> 105'in büyüme eğrisi	40
4.3 <i>A. foetidus</i> var. <i>pallidus</i> 359'un büyüme eğrisi.....	41
4.4 <i>A. awamori</i> 1A/4-60'ın büyüme eğrisi.....	41
4.5 <i>A. awamori</i> 8/2-3'ün büyüme eğrisi.....	42
4.6 <i>A. awamori</i> 8/3-19'un büyüme eğrisi.....	42
4.7 <i>A. niger</i> TR-99'un büyüme eğrisi	43
4.8 <i>A. niger</i> R-1'in büyüme eğrisi.....	43
4.9 <i>A. niger</i> R-177'nin büyüme eğrisi.....	44
4.10 <i>A. niger</i> R-183'ün büyüme eğrisi.....	44
4.11 <i>A. niger</i> 318-T'nin büyüme eğrisi.....	45
4.12 <i>A. aculatus</i> 1K4-50'nin büyüme eğrisi	45
4.13 <i>A. aculatus</i> 1K4-52'nin büyüme eğrisi	46
4.14 <i>A. tubingensis</i> 298-T'nin büyüme eğrisi	46

XIX

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Okratoksin-A üreticisi olduğu belirlenmiş bazı küf türleri	5
2.2 Bazı hayvanlarda OT-A için LD ₅₀ değerleri.....	13
2.3 Afrika'daki bitkisel orjinli gıdalarda OT-A düzeyleri	14
2.4 Amerika'daki bitkisel orjinli gıdalarda OT-A düzeyleri.....	15
2.5 Asya ve Avustralya'daki bitkisel orjinli gıdalarda OT-A düzeyleri	15
2.6 Avrupa'daki bitkisel orjinli gıdalarda OT-A düzeyleri.....	16
2.7 Bazı yem ve yem hammaddelerinde saptanan OT-A miktarları	22
2.8 Bazı ülkelerde OT-A için izin verilen maksimum tolere edilebilir miktarlar	24
2.9 Bazı okratoksin-A üreticisi küflerin büyüme koşulları	28
2.10 OT-A degradasyon aktiviteleri denenen <i>Aspergillus</i> strainleri	31
4.1 Agar Plug metodunun geri kazanım yüzdesi (%R)	47
4.2 Siyah sporlu küflerin okratoksin-A üretimleri.....	47
4.3 <i>A. tubingensis</i> 298-T'nin OT-A üretimine zamanın etkisi	49
4.4 <i>A. tubingensis</i> 298-T'nin OT-A üretimine sıcaklığın etkisi	49
4.5 <i>A. tubingensis</i> 298-T'nin OT-A üretimine % sakkarozun etkisi	50
4.6 <i>A. tubingensis</i> 298-T'nin OT-A üretimine pH'nın etkisi	51

1.GİRİŞ

Mikotoksinler, çeşitli mantar türleri tarafından sentezlenen, insan ve hayvanlar tarafından alındıkları zaman, latent, akut veya kronik karakterde zehirlenmelere neden olan kimyasal maddeler veya metabolitlerdir. Mikotoksin terimi mantar anlamına gelen “myco” ve zehir anlamına gelen “toxin” kelimelerinin birleşmesinden türetilmiştir (Arda, 1980; Kaya, 1990).

Mikotoksin oluşturan mantarlar dünyanın her tarafında yaygın şekilde bulunurlar (Şanlı, 1989).

Mikotoksinler çeşitli bitkisel ve hayvansal orjinli gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır ve bitkisel ürünlerde hasat öncesinde olduğu gibi hasat sonrasında da oluşabilmektedir. Süt ve süt ürünleri, et, yumurta gibi hayvansal ürünlerin mikotoksinlerle kontaminasyonu ise çoğunlukla mikotoksinlerle kontamine olmuş hayvan yemlerinin tüketilmesinden kaynaklanmaktadır (Coker, 1984).

Gerek sahada gerekse harmanlama, depolama, taşıma ve hazırlama sırasında şartlar (özellikle sıcaklık ve rutubet) mantarların gelişmesine uygun olduğu takdirde, tarım ürünleriyle bunlardan hazırlanan yem ve besinler mantarların istilasına uğrayarak mikotoksinlerle kolayca kirlenebilirler. Bu kirlenmelerin doğurduğu olayların hayvanlarda özellikle farkına varılmadan seyretmesi, ayrıca, gerek hayvan sağlığı ve ekonomik işletmecilik yönünden, gerekse kalıntıları vasıtasıyla doğuracakları toplum sağlığı riski bakımından günümüzde en çok ilgi uyandıran konuyu oluşturlar (Kaya, 1989; Kaya, 1990).

Mikotoksin içeren bitkisel besinlerle beslenen insanlarda, evcil hayvanlarda görülenlere benzer şekilde, karmaşık nitelikli, karaciğer, böbrek, deri, kan, sinir sistemi ve hormonal denge bozukluklarıyla kendini gösteren akut ve kronik zehirlenmeler meydana gelebilmektedir. Tek hücreli mantarlara bağlı

olarak yem ve gıdalarda küflenmeye neden olan ve bütün dünyada sıklıkla karşılaşılan bu doğal kirlenme durumunda, her yıl dünya tahıl ve yağlı tohum üretiminin en az %1'i çürüme-küflenme yüzünden işe yaramaz hale gelirken, %20'ye yakın kısmı da değişik derecelerde mikotoksinlerle kirlenirler (Şanlı, 1989).

Gıdalar ve yemlerde küflenmeye yol açan mantarlar başlıca üç kaynaktan gelirler. Birincisi, bitkinin büyümesi gelişmesi sırasında fitoparazit olarak yerleşen, ekim alanlarına bağlı mantar florasıdır; bu grupta, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Pullaria*, *Rhizopus*, *Alternaria* türleri bulunur. İkincisi, hasat sonucunda kirlenici olarak tarımsal ürünlere yansıyan, tarla mantar florasından nispeten daha düşük sıcaklık (20°C) ve rutubet (%60) şartlarına uyum sağlamış yani, ambar şartlarına alışmış olan *Aspergillus* ve *Penicillium* türleridir. Üçüncüsü, depolama koşullarının, mantarların üreyebileceği şartlar yönünde değişmesiyle ortaya çıkan ve *Fusarium*, *Sordaria*, *Popullaspora*, *Aspergillus* türlerinin içinde yer aldığı gruptur (Kaya, 1990).

Günümüzde 300 civarında mikotoksin bilinmektedir ve bu mikotoksinlerin çoğu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* ve *Rhizopus* gibi mantar cinslerince sentezlenmektedirler. Günümüze kadar yapılan araştırmaların çoğunluğunda aflatoksin ve trikotesenler üzerinde yoğunlaşmış; okratoksin (OT), patulin, sitrinin, sterigmatosistin, zearaleon ve siklopiazonik asit gibi ikinci grup mikotoksinlerle ilgili çalışmalar son yıllarda artmıştır (Goto,1990).

Okratoksinler, aflatoksinlerin keşfedilmesinden sonra, tanılanan mikotoksinlerin başlıca ana grubunu kapsamaktadır. Okratoksin A (OT-A) bu grubun en toksik bileşiğidir ve bu nedenden dolayı OT-A nefrotoksik etkisi ve

potansiyel karsinojenik aktivitesi yönünden artan bir ilgiyi üzerine çekmektedir (Kuiper-Goodman ve Scott, 1989, Pohland, 1993).

Bu çalışmada siyah sporlu küflerden *Aspergillus tubingensis* 298-T'nin üremesi ve OT-A sentezi üzerine pH, sıcaklık, zaman, % sakkaroz içeriği gibi bazı parametrelerin etkisi araştırılmıştır.



2.LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Okratoksin-A Üreticisi Küfler

Okratoksin-A ilk kez 1965 yılında Güney Afrikalı kimyacılar tarafından tanımlanmış ve D. B Scott tarafından sorgum tanelerinden izole edilen *Aspergillus ochraceus* K-804 suşundan izole edilmiştir (Fukal, 1990; Steyn, 1984).

Okratoksin-A, (OT-A) {(R)-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-L-phenylalanine}, hayvan ve insan sağlığı açısından tehlikeli oluşu nedeni ile tüm dünyada, gittikçe artan şekilde dikkatleri üzerine çeken bir mikotoksindir (Bauer, 1987; Holmberg ve ark., 1991; Kuiper-Goodman ve Scott, 1989; Marquardt ve ark., 1990; Marquardt ve ark.,1988).

Okratoksinler, nefrotoksik, immunosupresif, teratojenik ve karsinojenik özellikler gösteren mikotoksinlerdir (Smith ve Moss, 1985).

Okratoksin-A'nın 1965 yılında *A. ochraceus*'un bir sekonder metaboliti olarak keşfedilmesinden sonra, birçok *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri, okratoksin üreticisi olarak tanımlanmıştır, bu türler; *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. melleus*, *A. petrakii* (Ciegler, 1972; Hesseltine ve ark., 1972), *A. glaucus* (Chelkowski ve ark., 1987), *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. carbonarius* (Abarca ve ark., 1994; Téren ve ark., 1996) ve bazı *Penicillium* türlerini kapsamaktadır (Bridge ve ark., 1989; El-Banna ve ark., 1987; Pitt, 1987, Turner ve Aldridge, 1983). Günümüzde okratoksin A üreticisi olarak belirlenmiş türlerin bazıları çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

A. ochraceus ve bu grupta yer alan *Aspergillus* türleri genellikle dünyanın tropikal ve yarı tropikal bölgelerinde okratoksin sentezleyen küf türleri iken; *P.*

viridicatum gibi bazı *Penicillium* türleri daha soğuk bölgelerdeki dominant türlerdir. Nitekim Batı Kanada'da depolanan hububatlardaki OT-A sentezi ile ilgili olan küf türlerinin *P. viridicatum*, *P. cyclopium* ve *P. chrysogenum* olduğu saptanmıştır (Marquardt ve ark., 1990).

Sentezlenen okratoksin çeşidi ve miktarı, küf türüne ve suşuna bağlı olduğu gibi substratın nem ve besin içeriği, inkübasyon sıcaklığı gibi çevresel faktörlere de bağlıdır (Marquardt ve ark., 1990).

Çizelge 2.1 Okratoksin-A üreticisi olduğu belirlenmiş bazı küf türleri (Eltem ve ark. 2002).

Tür Adı	Referans
<i>Aspergillus alliaceus</i>	(Abarca ve ark., 1997)
<i>Aspergillus alutaceus</i> var. <i>alutaceus</i>	(Chelack ve ark., 1991)
<i>Aspergillus auricomus</i>	(Varga ve ark., 1996)
<i>Aspergillus awamori</i>	(Frank, 1991)
<i>Aspergillus candidus</i>	(Abarca ve ark., 1997)
<i>Aspergillus foetidus</i>	(Varga ve ark., 1996)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	(Horie, 1995)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(Abarca ve ark., 1997)
<i>Aspergillus glaucus</i> (<i>Eurotium herbarium</i>)	(Chelkowski, 1987)
<i>Aspergillus melleus</i>	(Frank, 1991)

Çizelge 2.1 (devam)

<i>Aspergillus niger</i>	(Varga ve ark., 1996)
<i>Aspergillus niger var. niger</i>	(Abarca ve ark., 1994)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	(Skrinjar ve ark.,1992; Varga ve ark. 1996)
<i>Aspergillus ostianus</i>	(Frank, 1991)
<i>Aspergillus petrakii</i>	(Frank, 1991)
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	(Skrinjar ve ark.,1992; Varga ve ark. 1996)
<i>Aspergillus sulphureus</i>	(Skrinjar ve ark.,1992; Varga ve ark. 1996)
<i>Aspergillus sydowi</i>	(Ueno ve ark., 1991)
<i>Aspergillus tamarii</i>	(Abarca ve ark., 1997)
<i>Aspergillus terreus</i>	(Ueno ve ark., 1991)
<i>Aspergillus wentii</i>	(Varga ve ark., 1996)
<i>Aspergillus versicolor</i>	(Abarca ve ark., 1997)
<i>Eurotium amstelodami</i>	(Abarca ve ark., 1997)
<i>Eurotium chevalieri</i>	(Abarca ve ark., 1997)
<i>Eurotium rubrum</i>	(Abarca ve ark., 1997)

Çizelge 2.1 (devam)

<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	(Krivobok ve ark., 1995)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	(Skrinjar ve ark., 1992)
<i>Penicillium commune</i>	(Skrinjar, 1992)
<i>Penicillium crustosum</i>	(Frank, 1991)
<i>Penicillium cyclopium</i>	(Frank, 1991)
<i>Penicillium cyclopium</i> var. <i>aurantiogriseum</i>	(Frank, 1991)
<i>Penicillium funiculosum</i>	(Frank, 1991)
<i>Penicillium glandicola</i>	(Frank, 1991)
<i>Penicillium palitans</i>	(Frank, 1991)
<i>Penicillium purpurescens</i>	(Frank, 1991)
<i>Penicillium variable</i>	(Krivobok ve ark., 1995)
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	(Skrinjar ve ark., 1992)
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>verrucosum</i>	(Skrinjar ve ark., 1992)
<i>Penicillium viridicatum</i>	(Pohland ve ark., 1992)

2.2 Okratoksin-A'nın Kimyasal Yapısı

Okratoksin-A, *Aspergillus* ve *Penicillium* spp. tarafından üretilen bir mikotoksindir (Krogh, 1976; Krogh, 1978).

Okratoksinler, L- β -fenilalanin bağlı izokumarin türevleridir ve pentaketidler olarak sınıflandırılmışlardır. Okratoksin türevleri geniş bir oranda, üretici küflerin laboratuvar kültürlerinden izole edilmiş olmakla beraber, en toksik olanı ve ayrıca en yaygın bulunanı da okratoksin-A'dır (Abarca ve ark., 2001).

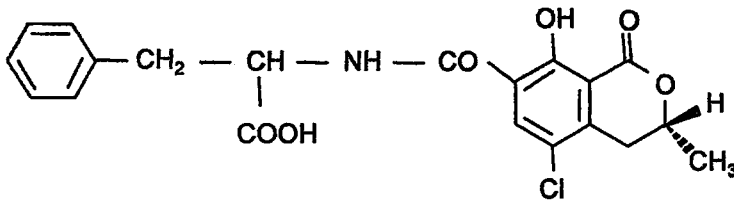
Okratoksin-A kristalleri renksiz olmakla birlikte, asit koşullarda yeşil, alkali koşullarda mavi floresans vermektedir (Coker, 1984; Mirocha ve ark., 1980; Steyn, 1984; Ueno, 1987).

Kristal halde renksiz bir bileşik olan okratoksin polar organik zgenlerde yüksek oranda, suda ise çok az çözünmekte olup, sulu sodyum bikarbonatla erimektedir (Ueno, 1987).

Işık ve havada dayanıksızdır. Işığa kısa süreli maruz kalma sonucunda özellikle nemli ortamlarda parçalanır ve solar. Etanol zltileri soğukta ve karanlıkta saklanırsa bir yıldan fazla süre stabil kalmaktadır (Turner, 1971; Marquardt ve ark., 1990).

Yapılan çalışmalarda  yeni okratoksin-A analog bulunmuştur, bunlar; fenilalanin molekülü ile yer değiştiren serin, hidroksprolin ve lizin'dir (Hadidane ve ark., 1992).

Okratoksin-A'nın dihidroizokumarin kısmına yapısal olarak benzeyen mellein ve 4-hidroksimellein ise *A. ochraceus* ve diğer suşlardan izole edilmiştir (Ueno, 1987).



Şekil 2.1 Okratoksin-A'nın kimyasal yapısı (Marquardt ve ark., 1990).

2.3 Okratoksin-A'nın Biyolojik Etkileri

Okratoksin-A; tahıl, fındık, yeşil kahve taneleri, kakao taneleri, kurutulmuş meyvalar, baharatlar, şarap ve birayı kapsayan çeşitli gıdalarda olduğu kadar, OT-A içeren rasyonlarla beslenen domuzların böbreklerinde saptanmış olan, nefrotoksik, nefrokarsinojenik bir mikotoksindir (Pittet ve ark., 1996).

Çeşitli araştırmacılar bir mikotoksin olan okratoksin-A'nın karsinojenik, genotoksik, teratojenik, immunotoksik ve nefrotoksik olduğunu ortaya koymaktadır. Okratoksin-A, DNA kırılmaları, protein sentezinin inhibisyonu ve glikojenezis, lipid peroksidasyonu, mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun bozulması, kanın pıhtılaşmasının engellenmesi ve apoptotik etkisi nedeniyle büyük önem taşımaktadır (Soyöz ve Özçelik, 2002).

Bir nefrotoksin olan OT-A'nın çeşitli hayvanlarda nefrotoksik etkiler gösterdiği saptanmıştır. Özellikle Bulgaristan, Romanya ve Yugoslavya'da insanlarda ölüm oranı yüksek bir böbrek hastalığı olarak bilinen "BEN" (Balkan Endemik Nefropatisi) ile, İskandinav ülkelerinde OT'nin neden olduğu mikotoksik domuz nefropatisi arasındaki benzerlikler nedeniyle OT-A'nın insanlarda da endemik hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir (Coker, 1984;

Fukal, 1990; Mirocha ve ark, 1980; Pitt ve Leistner, 1991; Steyn, 1984; Ueno, 1987).

Nefrotoksik özelliğinden dolayı en çok etkilenen organların başında böbrekler gelmektedir. Ayrıca karaciğer, miyokardiyal sistem, gastrointestinal sistem, lenf sistemi, iskelet sistemi, hemaploiteik dokular ve üreme sistemi gibi sistemlerde etkilenen dokular arasında yer almaktadır (Bullerman, 1979; Breiholtz-Emmanuelsson ve ark., 1993; Coker, 1984; Fukal, 1991; Goto, 1990; Marquardt ve ark., 1990; Pitt ve Leistner, 1991).

BEN ilk kez 1950'lerde Bulgaristan, Romanya ve Yugoslavya'nın bazı bölgelerinde öldürücü kronik bir hastalık olarak ortaya çıkmıştır. Hastalık; böbrek zarında değişiklik, tubular dejenerasyon, intestinal fibrosis ve glomeruli hiyalinizasyonu belirtilerini göstermektedir. Domuzlarda görülen endemik nefropati ile BEN arasındaki benzerlikler nedeniyle OT-A'nın BEN etmeni olabileceği düşünülmüş ve toksik endemik nefropati görülen insan topluluklarının bulunduğu yerlerde insan kanı ve hububat örneklerinden izole edilmiştir (Fukal, 1991; Marquardt ve ark., 1990; Steyn, 1984; Ueno, 1987).

OT insan sağlığını iki yolla etki altına almaktadır. Birincisi OT üreten küflerle kontamine olmuş gıdanın direkt tüketimi (primer mikotoksikosis), diğeri ise OT ile kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvan etlerinin tüketimidir (sekonder mikotoksikosis). OT ile kontamine olmuş yemlerin tüketilmesi sonucu toksin, hayvanlarda kan, böbrek, karaciğer, kas gibi farklı dokulara dağılmaktadır. OT-A, yağda çözündüğü ve dışarıya salgılanmadığı için özellikle yağlı dokularda birikmekte ve bu şekilde toksin içeren dokunun tüketilmesi ile insana geçmektedir. Bu iki yoldan biriyle toksin alan kişilerde BEN görülebilmektedir (Breiholtz-Emanuelsson ve ark., 1993; Fukal, 1990; Goto, 1990; Pitt ve Leistner, 1991; Steyn, 1984; Ueno, 1987).

OT-A'nın nefrotoksik etkisi, şimdiiye kadar test edilmiş bütün memeli türleri üzerinde kanıtlanmıştır. OT-A nefrotoksik etkisi nedeniyle domuz ve kümes hayvanları endüstrisinde yüksek ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Geviş getiren hayvanlarda "okratoksikozis" rumen (birinci mide) mikroorganizmalarının OT-A'yı toksik olmayan α -formuna hidrolize etme yetenekleri nedeniyle nadir olarak bildirilmiştir (Kuiper Goodman ve ark., 1989).

OT-A miktarı özellikle kanatlılar için önem taşımaktadır. Cıvcıvlerde 0,5 mg/kg'lık bir düzeyin büyümeyi yavaşlattığı, bu miktar yükseldikçe ölüm oranının arttığı görülmüştür (Akyıldız, 1977).

Okratoksin ayrıca karaciğer, üreme organları ve lenf sistemlerini etkiler, büyüme hızını yavaşlatır. Okratoksin zehirlenmesi kanatlılarda kendini değişik şekillerde gösterir. Hastalanmış hayvanların böbrekleri şişer, vücut boşlukları ile değişik organlarında ürüt kristallerinin toplanmış olduğu görüldür, karaciğer şişer ve rengi açılır (Kocabey, 1995; Çetin, 1990).

Okratoksinin kanatlılarda canlı ağırlık artışını ve yumurta verimini azalttığı, ayrıca damızlıklarda performansı düşürdüğü ve izleyen nesilleride etkilediği ileri sürülmektedir. Okratoksin toksikasyonu 1 mg/kg düzeyinde görülmekte, bunun üzerine çıkıldığında belirtilerin şiddeti artmaktadır. Akut zehirlenmelerde 8 mg/kg'lık dozlar yoğun ölümlere neden olmuştur (Kocabey, 1995).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, OT-A'nın diğer mikotoksinlerle etkileşiminin olduğunu göstermiştir (Pohland ve ark., 1992).

Biyokimyasal düzeyde OT-A, fenilalaninin yerini alarak t-RNA kompleksine bağlanmakta ve fenilalanin-tRNA kompleksinin sentezini içeren enzimi inhibe etmek suretiyle fenilalaninin peptidlere bağlanmasını engellemektedir (Dirheimer ve Creepy, 1991).

Ayrıca siklopiazonik asitle birleştğinde kümes hayvanlarının dalak-karaciğer ve pankreasının büyümesine, serum albumini ve total protein konsantrasyonunun azalmasına, trigliserit ve ürik asit konsantrasyonunun artmasına yol açarak kümes hayvanlarını etkilediği gösterilmiştir (Gentles ve ark., 1999).

OT-A'nın insanlarda BEN ve domuzlarda mikotoksik nefropati yanında tavuk, köpek, ördek, hindi, fare, sıçan, hamster, koyun, alabalık gibi çeşitli hayvanlarda karaciğer nekrozisine, ayrıca fetal ağırlıklarda azalma, doğum öncesi ölüm, düşük, annede toksikozis, fare, sıçan ve hamsterlarda çeşitli sakatlıklara neden olduğu bildirilmiştir (Fukal, 1991; Marquardt ve ark., 1990; Mirocha ve ark., 1980; Steyn, 1984).

Okratoksinlerin akut toksisitesinin bir göstergesi olan LD₅₀ değerleri hayvan cinslerine bağlı olmakla birlikte, bir cins içinde de yaş, cinsiyet, diyet, vücuda veriliş yolu, genetik farklılıklar ve okratoksinin formu gibi faktörlerden de etkilenmektedir (Hussein ve ark., 1997). OT-A'nın çeşitli hayvanlara ait LD₅₀ değerleri çizelge 2.2.'de verilmiştir (Mirocha ve ark., 1980).

Örneğin; OT-A akut oral LD₅₀ dozunun Wistar sıçanlarda 22 mg/kg , erkek sıçanlarda 28 mg/kg, dişi sıçanlarda 20 mg/kg (Steyn, 1984), genç sıçanlarda ise LD₅₀ oral dozunun 22 mg/kg olduğu bildirilmiştir (Pitt ve Leistner, 1991).

Çizelge 2.2 Bazı hayvanlarda OT-A için LD₅₀ değerleri (Mirocha ve ark., 1980).

Hayvan Cinsi	LD ₅₀ Değeri
Ördek	150 mg/kg
Erkek sıçan	28 mg/kg
Dişi sıçan	20 mg/kg
Yeni doğmuş sıçan	3,90 mg/kg
İnek	13 mg/kg
Keçi	3 mg/kg
Dişi kobay	8,1 mg/kg
Erkek kobay	9,1 mg/kg
Bir günlük civciv	3,3-3,9 mg/kg
Alabalık	4,67-5,53 mg/kg

2.4 Çeşitli Ürünlerde Okratoksin-A Varlığı

Yeşil kahve tanelerinde, arpa, buğday, ekmek ve baharat gibi diğer bitkisel ürünlerde OT-A kontaminasyonu tüm dünyada ciddi bir sağlık tehlikesidir (Smith ve Moss, 1985).

OT'in dünyanın çeşitli ülkelerinde baklagillerde, hububatlarda ve diğer bitkisel ürünlerde, hayvan yemlerinde, hayvan etlerinde ve insan dokularındaki varlığı saptanmıştır. OT-A bitkisel ürünler içerisinde özellikle mısır, buğday, arpa, sorgum, yulaf, baklagiller, yer fıstığı ve karışık yemlerde bulunan en önemli

mikotoksinlerden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca domuz dokularında da yaygın olduğu ve OT-A düzeyinin hayvansal ürünlerde hububatlardakinden daha fazla olduğu bildirilmiştir (Marquardt ve ark., 1990).

Afrika, Amerika, Asya ve Avustralya ile Avrupa'da çeşitli ülkelerdeki bitkisel ürünlerde OT-A kontaminasyonu sırasıyla Çizelge 2.3., Çizelge 2.4, Çizelge 2.5, Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.3 Afrika'daki bitkisel orjinli gıdalarda OT-A düzeyleri (Van Egmond ve Speijers, 1994).

Ürün	Ülke	Örnek sayısı	Kontaminasyon %'si	Ortalama OT-A miktarı (µg/kg)
Börülce	Senegal	31	16	34
Mısır	Mısır	3	33	12
Buğday	Mısır	3	33	10
Pirinç jermi	Mısır	3	33	577
Pirinç jermi keki	Mısır	3	33	4
Pirinç kepeği	Mısır	3	33	9
Bakla	Mısır	3	33	7

Çizelge 2.4 Amerika'daki bitkisel orijinli gıdalarda OT-A düzeyleri (Van Egmond ve Speijers, 1994).

Ürün	Ülke	Örnek sayısı	Kontaminasyon %'si	Ortalama OT-A miktarı (µg/kg)
Mısır	ABD	293	1	83-166
Buğday (kışlık kırmızı)	ABD	297	11	5-115
Buğday (spring kırmızı)	ABD	286	2,8	5-115
Arpa	ABD	127	14,2	10-40
Çekirdek kahve	ABD	267	7,1	20-360
Kuru baklagil	ABD	60	0	<30

Çizelge 2.5 Asya ve Avustralya'daki bitkisel orijinli gıdalarda OT-A düzeyleri (Van Egmond ve Speijers, 1994).

Ürün	Ülke	Örnek sayısı	Kontaminasyon %'si	Ortalama OT-A miktarı (µg/kg)
Mısır	Hindistan	22	4,5	+
Buğday	Hindistan	30	3,3	+
Baharat	Hindistan	108	4,5	+

Çizelge 2.5 (devam)

Pirinç	Hindistan	30	6,6	+
Kurutulmuş meyve	Hindistan	74	5,4	+
Yeşil kahve	Japonya	68	7,3	3,2-17

Çizelge 2.6 Avrupa'daki bitkisel orijinli gıdalarda OT-A düzeyleri (Van Egmond ve Speijers, 1994).

Ürün	Ülke	Örnek sayısı	Kontaminasyon %'si	OT-A düzeyi (µg/kg)
Mısır	Fransa	463	2,6	5-200
Mısır	Fransa	461	1,3	20-200
Mısır	Yugoslavya	542	8,3	6-140
Mısır	Almanya	40	7,5	0,1-137
Mısır	Hollanda	9	0	<0,1
Mısır	İngiltere	29	37,9	50-500
Mısır	Bulgaristan	22	9,0	10-25
Mısır	Bulgaristan	22	27,3	25-35
Mısır	Polonya	123	1,6	25-400

Çizelge 2.6 (devam)

Mısır	Bulgaristan	151	57,8	0,2-1418
Mısır	Bulgaristan	113	26,7	0,2-235
Mısır	İtalya	90	15,0	1-2
Mısır	Avusturya	27	11,1	5-100
Buğday	Yugoslavya	130	8,5	14-135
Buğday	Danimarka	194	37	0,8-37
Buğday (ecol)	Danimarka	36	46	1,2-21
Buğday	Polonya	239	11,7	1,2-21
Buğday	Almanya	64	1,6	0,4
Buğday	Hollanda	38	15	0,1-4,2
Buğday	Avusturya	41	9,2	5-100
Buğday kepeği	Almanya	84	10,7	6,8
Buğday kepeği	Danimarka	57	10,5	5-20
Buğday kepeği	Danimarka	57	68	0,5-12
Buğday kepeği	Danimarka	15	66	0,1-26

Çizelge 2.6 (devam)

Buğday unu	Polonya	137	19,7	3700
Pirinç	Danimarka	267	37	2,5-120
Pirinç	Danimarka	53	81	0,7-120
Pirinç unu	Polonya	78	26,9	5410
Pirinç	Polonya	228	27,2	5-2400
Pirinç	Almanya	64	1,6	0,4
Pirinç	Hollanda	14	36	0,1-16,8
Pirinç	Avusturya	41	43,9	5-100
Yulaf	Danimarka	28	43	0,8-5,6
Yulaf	Danimarka	9	44	0,2-4,2
Yulaf	Çekoslovakya	19	1	1-2
Yulaf	Almanya	21	38	1,2
Yulaf	Hollanda	18	22	0,1-2,4
Yulaf	Avusturya	48	47,3	5-1000
Buğday, pirinç, yulaf	Almanya	232	12,6	0,1-206
Arpa	Polonya	616	8,8	5-1200
Arpa	Danimarka	15	33	0,2-14
Arpa	Danimarka	13	54	0,2-13

Çizelge 2.6 (devam)

Arpa	Danimarka	50	8	9-189
Arpa	Yugoslavya	64	12,5	14-27
Arpa	Çekoslovakya	48	2,1	3800
Arpa	Avusturya	27	11,1	5-1000
Pirinç	Hollanda	11	0	<0,1
Hububat	Almanya	765	3,1	11,8
Tahıl	Almanya	49	4,1	18-22
Tahıl	Almanya	43	42	2,0-304
Kuru baklagil	Bulgaristan	24	16,7	25-27
Kuru baklagil	Bulgaristan	157	48,1	0,05-260
Kuru baklagil	Bulgaristan	113	27,2	0,2-285
Bezelye	İsveç	71	8,5	10-442
Soya fasulyesi	İngiltere	25	36	50-500
Soya unu	İngiltere	21	19	50-500
Tane kakao	İngiltere	56	18	100-500

Çizelge 2.6 (devam)

Tane kakao (kavrulmuş)	İngiltere	19	16	100
Kahve	İtalya	19	58	0,2-15
Kahve (kavrulmuş)	İtalya	50	0	<0,01
Yer fıstığı	Polonya	609	0	<5,0
Protein konsantratu	Polonya	132	0	<5,0
İrmik	Almanya	4	50	0,5
Malt	Almanya	85	1,2	12
Bira	Almanya	75	0	<0,05
Ekmek	Polonya	368	17,2	1360
Kabuksuz buğday yulafi	Polonya	35	11,4	1140
Ekmek	İngiltere	50	2,0	210
Un	İngiltere	7	28,5	490-2900

Hububatlar yada domuz ve kümes hayvanları etleri yararlılıklarına karşın, okratoksin-A kontaminasyonuna özellikle hassas oldukları bilinmektedir (Kuiper Goodman ve ark.1989). Kahve (Bucheli ve ark., 2000; Buradaspal ve Legarda,

1998; Jorgensen, 1998; Nakajima ve ark., 1997; Téren ve ark., 1997; Ueno, 1998; Ueno ve ark., 1991), bira (Jorgensen, 1998; Legarda ve Buradaspal, 1998, Ueno, 1998), şarap ve üzüm suyu (Buradaspal ve Legarda, 1999; Ueno, 1998; Visconti ve ark., 1999; Zimmerli ve Dick, 1996) ve süt (Skaug, 1999) gibi bazı gıdaların birçok çeşidinde OT-A saptanmasında artış görülmektedir. Kontamine gıdaların sürekli tüketimi, insanların devamlı ve artan oranda OT-A'ya maruz kalmasına yol açarak, hem insan kanında (Peraica ve ark.,1999), hem de anne sütünde (Heenan ve ark., 1998; Jonsyn ve ark., 1995; Micco ve ark.,1995) OT-A'ya rastlanma sıklığı birçok ülkede artış göstermektedir.

Çeşitli okratoksijenik küflerin un, ekmek, mısır unu, patlamış mısır, yer fıstığı, pecan cevizi, pişirilmiş et, toz kakao, peynir, şerbetçi otu, olgunlaştırılmış salam, sosis, kürlenmiş jambon, küflü et, siyah ve kırmızı biber, makarna, kuru baklagiller, soya fasülyesi, dondurulmuş unlu mamuller, evde buzdolabında soğutulmuş yada soğutulmamış yiyecekler gibi pek çok gıda grubunda saptandığı bildirilmiştir (Bullerman, 1979).

OT-A sözü edilen çeşitli bitkisel ürünler yanında pek çok ülkede et ürünlerinde, özellikle domuzlarda saptanmıştır (Marquardt ve ark., 1990).

Türkiye'de çeşitli bitkisel ve hayvansal ürünlerdeki OT-A kontaminasyonu ile ilgili tarama çalışmaları oldukça az sayıdadır. Özkazanç ve arkadaşları (1992), 1986-1989 yılları arasında Türkiye'nin yedi farklı coğrafik bölgesindeki 25 ayrı yem fabrikasından aldıkları toplam 302 adet karma yem, yem hammaddesi ve gıda örneklerinde çeşitli mikotoksinleri aradıkları çalışmalarında örneklerin %31,65'inde mikotoksin saptamışlardır. Mikotoksin saptanan bu örneklerin %11,2'sinde aflatoksin G₁, %0,3'ünde aflatoksin G₂ ve %18,2'sinde ise OT-A'ya rastlamışlardır. OT-A saptanan örneklerde ise örneklerin %21,4'ünde 10-20 ppb arasında, %23,4'ünde 20-40 ppb arasında,

%55,2'sinde ise 40 ppb'den fazla OT-A saptanmıştır. Bazı yem ve yem hammaddelerinde saptanan OT-A miktarları Çizelge 2.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7 Bazı yem ve yem hammaddelerinde saptanan OT-A miktarları (Özkazanç ve ark., 1992).

Örnek	Örnek sayısı	OT-A içeren örnek %'si	OT-A miktarı (ppb)	
			Minimum	Maksimum
Civciv geliştirme yemi	70	14,2	4	100
Etlük piliç yemi	70	24,2	10	150
Yumurta tavuğu yemi	60	24,5	10	30
Damızlık tavuk yemi	14	21,4	15	40
Sığır besi yemi	14	15,3	40	-
Mısır	23	8,6	25	40
Soya fasulyesi	14	7,1	16	-
Ayçiçeği küspesi	9	33,3	40	100
Balık unu	16	12,5	30	60
Et kemik unu	6	-	-	-
Pamuk tohumu	5	-	0,05	0,1

Kaya ve ark., (1990), yapmış oldukları tarama çalışmasında yem hammaddesi olarak kullanılan 20'si mısır, 9'u soya fasulyesi, 11'i pamuk tohumu küspesi ve 11'i de ayçiçek küspesi olmak üzere toplam 51 örnekte aflatoksin B₁, aflatoksin B₂, aflatoksin G₁ ve OT-A içeriklerini araştırmışlardır. Çalışma sonunda 1 mısır ve 6 ayçiçek küspesi örneğinde OT-A, 1 pamuk tohumu küspesinde aflatoksin saptanmış, OT-A miktarının mısırdaki 260 ppb, ayçiçek küspesinde ise 200-800 ppb arasında, ortalama 438 ppb olduğu belirlenmiştir.

2.5 Tolere Edilebilir Alım Limitleri

JECFA tarafından yapılan değerlendirmelerde öngörülen haftalık tolere edilebilir OT-A alım miktarları 100 ng/kg/vücut ağırlığı'dır. Bu da günlük 14 ng/kg/vücut ağırlığına tekabül etmektedir (Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 1998), (IARC Anticipated Carcinogenes., 1976).

Çeşitli bitkisel ve hayvansal gıdalarda oldukça yaygın olan OT'lerin gıda ve yemlerde izin verilen maksimum miktarlarını içeren limitler son yıllarda çeşitli ülkelerin yönetmeliklerinde yer almaya başlamıştır. Dünyada 77 ülkede mikotoksinlerle ilgili çeşitli yönetmelikler mevcut olup, 8'inde bir veya birden fazla üründe OT-A ile ilgili standart, 3'ünde ise tavsiye niteliğinde kararlar vardır. Bu ülkelerdeki OT-A'ya ait limitler Çizelge 2.8'de verilmiştir. Ayrıca birkaç ülkede OT-A yönetmeliği ile ilgili tavsiye niteliğinde kararlar vardır. OT-A için tavsiye edilen limitler bebek ve çocuk mamalarında 1-5 µg/kg, diğer gıdalarda 2-50 µg/kg ve yemlerde 5-300 µg/kg arasındadır. Avrupa topluluğunda ise OT-A düzeyinin bebek mamalarında 1 µg/kg ve hububatlarda ise 5 µg/kg olması gerektiği belirtilirken (Van Egmond, 1996), 1997 yılında Avrupa

topluluğuna dahil ÷lkelerde t÷m gıdalar için OT-A miktarının 4-5 ppb olarak sınırlandırıldığı bildirilmiştir (Anon, 1997a).

Çizelge 2.8 Bazı ÷lkelerde OT-A için izin verilen maksimum tolere edilebilir miktarlar (Van Egmond, 1991).

÷lke	÷r÷n	Tolere edilen miktar ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Düşünceler
Brezilya	Pirinç,arpa, kuru baklagiller, mısır	50	
ekoslavya	Aşağıdakiler dışındaki t÷m gıdalar	20	
	Bebek mamaları (tüetime hazır ÷r÷ndeki miktar)	1	
	ocuk gıdaları	5	
Danimarka	Domuz böbreği	25	OT-A içeriği $>25\mu\text{g}/\text{kg}$ ise t÷m karkas red edilir.

Çizelge 2.8 (devam)

Danimarka	Domuz böbreği	10	OT-A içeriği 10-25µg/kg ise böbrek, karaciğer ve diğer iç organlar red edilir.
	Domuz böbreği	<10	Sadece böbrek red edilir.
Fransa	Hububatlar	30	Öneri niteliğinde
Macaristan	Tüm gıdalar	20	
İsrail	Yemlik tahıllar	300	
Hollanda	Hububatlar	3	Öneri niteliğinde
Romanya	Tüm gıdalar ve tüm yemler	5	
İsveç	Tüm domuz yemleri	100	
	Tüm kanatlı yemleri	1000	
İngiltere	Hububatlar	10	Endüstriyel öneri
Yunanistan	Kahve	20	

Türkiye’de ise 2002 yılında yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeks Yönetmeliğinde mikotoksinlerden aflatoksin, patulin ve okratoksin-A’nın gıdalardaki maksimum miktarına ilişkin değerlere yer verilmiştir. Buna göre izin verilen maksimum okratoksin-A miktarı, işlenmemiş tahıl tanelerinde (çeltik ve karabuğday dahil) 5 ppb, tahıllardan elde edilen bütün ürünler (tahıl, bazı işlenmiş ürünler ve doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl taneleri) 3 ppb, kuru üzümde ise 10 ppb olarak belirtilmiştir.

2.6 Düzenleme

Meslek Güvenliği ve Sağlık Yönetimi (Occupational Safety and Health Administration) OT-A’yı Risk Bildirme Standardı ve laboratuvarlardaki Kimyasal Riskler bölümü altında grup 2B de sınıflandırmaktadır (Occupational Safety and Health Administration). Uluslararası Kanseri Araştırma Dairesi’nin (International Agency for Research on Cancer "IARC") son monografında OT-A potansiyel kanserojen olarak kabul edilmiş ve (IARC, 1993), (IARC, WHO/IARC, IARC Scientific Publications, 1987), (Report on Carcinogens "ROC", 2001) 17 Eylül 1998’de Gıda Bilim Komitesi tarafından kanserojen, nefrotoksik, teratojen, immunotoksik ve muhtemel nörotoksik olarak yayımlanmıştır.

2.7 Okratoksijenik Küflerin Üremesine ve Okratoksin Sentezine Etki Eden Faktörler

Mikotoksijenik küflerin üremesine ve mikotoksin sentezine etki eden faktörler; su aktivitesi, pH, ortamdaki antimikrobiyal maddeler gibi iç etmenler

ve depolama sıcaklığı, ortamın nisbi nemi, ortamdaki gazlar gibi dış etmenler olarak incelenebilir (Karagözlü, 1998).

Su aktivitesi açısından durum değerlendirildiğinde, *A. ochraceus*'un gelişebilmesi için gerekli minimum su aktivitesi değeri 0,77 iken, organizmanın OT sentezleyebilmesi için gerekli su aktivitesi değerinin 0,88 olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan *P. cyclopium*'un gelişebildiği minimum su aktivitesi değeri 0,82, *P. viridicatum*'unki ise 0,81 iken; *P. cyclopium* ve *P. viridicatum*'un 0,90'ın altındaki su aktivitesi değerlerinde OT sentezleyemedikleri saptanmıştır. Çoğunlukla toksin sentezi için gerekli minimum su aktivitesi değeri, organizmanın gelişebilmesi için gerekli minimum su aktivitesi değerinden daha yüksektir. Organizmanın toksin sentezleyebildiği su aktivitesi değerine substrat büyük ölçüde etki etmektedir. Örneğin, *A. ochraceus* tavuk yeminde 0,88 su aktivitesinde OT sentezlerken, Malt Extract Agar'da 0,99 su aktivitesinde OT sentezlemektedir (Bullerman ve ark., 1984; Northolt ve Bullerman, 1982; Sillikler ve ark., 1980).

Ramos ve ark., (1998), *A. ochraceus*'un 3 straini tarafından, arpa taneleri üzerinde okratoksin üretimi, "arpa ekstrakt agar ortamı" ve arpa tanelerinde büyüme üzerine, su aktivitesi, sıcaklık, zaman ve bunların etkileşimlerini araştırdıkları çalışmada, maksimum okratoksin üretimi üzerine, sıcaklığın önemli olmadığı farzedilirse, her zaman 0,98 su aktivitesinde ulaşıldığını saptamışlardır.

P. cyclopium ve *P. viridicatum* 4-31°C arasındaki sıcaklıklarda OT sentezlerken, *A. ochraceus*'un 12 °C'nin altındaki değerlerde toksin sentezleyemediği bildirilmiştir. Ancak toksin sentezi için gerekli olan sıcaklık derecesinde substratın da etki ettiği belirtilmiştir (Bullerman ve ark., 1984). Yapılan bir çalışmada *P. verrucosum* var. *cyclopium*'un peynirde 20-24 °C

arasında, katı besiyerinde ise 4-24 °C arasındaki sıcaklıklarda toksin sentezleyebildiği saptanmıştır (Norholt ve Bullerman, 1982).

A. ochraceus ve *P. viridicatum*'un arpa üzerinde, OT-A üretimine zaman, sıcaklık ve inokulum boyutunun etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *A. ochraceus* 589.68 ve *P. viridicatum* tarafından 6 gün, *A. ochraceus* SLV tarafından ise 8 gün sonrası OT-A üretimi başlamıştır (Hagbglom, 1982).

pH açısından OT-A'nın pH 5,5'de, pH 4,5'e göre daha fazla sentezlendiği belirtilmekle birlikte; yapılan araştırmalarda pH değişikliklerinin OT sentezini çok fazla etkilemediği bildirilmiştir (Karagözlü, 1998).

Çizelge 2.9 Bazı okratoksin-A üreticisi küflerin büyüme koşulları (Eltem ve ark. 2002).

Fungus Adı	Optimum Temperatür	Minimal Temperatür	Minimal Nisbi Nem
<i>Aspergillus glaucus</i>	30	-8	0,65
<i>Aspergillus ochraceus</i>	28-32	6	0,80
<i>Penicillium chrysogenum</i>	25-28	-4	0,85
<i>Penicillium cyclopium</i>	25-30	-2	0,84
<i>Penicillium viridicatum</i>	21-23	-2	0,81

2.8 Üreme ve Toksin Sentezinin Kontrolü

Mikotoksin sentezinin engellenmesi, özellikle mikotoksijenik küflerin gıdaya bulaşmasının önlenmesi ve daha sonra da mikotoksin sentezine etki eden faktörlerin kontrol altında tutulmasıyla mümkün olmaktadır. Nem içeriği

düşürülerek veya kontrollü depolama sıcaklığı ve atmosfer ile mikotoksijenik küf gelişimi ve mikotoksin sentezi önlenmektedir. *Aspergillus* türlerince sentezlenen aflatoksin, OT ve diğer toksinlerin 5-8°C altındaki sıcaklıklarda sentezlenemedikleri bildirilmiştir. Kür edilmiş etler, arpa, buğday, soya gibi gıdaların mikotoksijenik küf gelişimi, dolayısıyla mikotoksin sentezi için oldukça uygun olduğu bilinmektedir. Bu durumda sıcaklık ve nem kombinasyonları dikkate alınarak kontrol sağlanmaya çalışılabilir (Bullerman ve ark., 1984).

Çeşitli antimikotik maddelerin, mikotoksijenik küflerin gelişimi ve mikotoksin sentezi inhibisyonlarına ilişkin etkileri araştırılmaktadır. Bu çerçevede yapılan çalışmalarda sorbik asit, propiyonik asit, benzoik asit ve bunların tuzları, sodyum diasetat, esansiyel yağlar en çok kullanılan maddelerdir (Bullerman ve ark., 1984).

OT-A nispeten stabil bir molekül olup gıdalara uygulanan çoğu işlem aşamalarında aynı miktarda kalmaktadır. OT-A'nın doğal olarak kontamine örneklerde, özellikle en yaygın olarak bulunduğu arpa ve buğdayın temizlenme ve öğütme aşamalarında uzaklaştırılmadığı ve toksinin un ve kepekte yaklaşık aynı miktarda saptandığı bildirilmiştir. Diğer yandan OT-A'nın hububat ve ürünlerinin depolanma aşamasında yavaşça yıkıma uğrayabildiği, ortam sıcaklığı ve diğer faktörlere bağlı olarak hububatlardaki kızışma sonucunda nem içeriğindeki değişimin toksinin yıkımına etki ettiğide belirtilmiştir (Boudra ve ark., 1995).

Diğer yandan kakaonun sütlü çikolataya işlenmesi sırasında OT-A'nın büyük ölçüde yıkıma uğradığı (Miraglia ve ark., 1993); sosisin kurutulması sırasında büyük oranda stabil kaldığı, ancak domuz ürünlerinin kızartılması sırasında % 20'sinin kayba uğradığı, domuz böbreğinin dondurulması sırasında

stabil kaldığı ve oda sıcaklığında depolamadan sonra peynirde kısmen saptandığı bildirilmiştir (Bullerman, 1981; Harwig ve ark., 1983).

İnsan ve hayvan sağlığı açısından mikotoksinlerin zararlı etkilerine engel olunmasında en iyi yaklaşım genellikle, bitkilerde ve yem katkılarında fungusların büyüme ve mikotoksin üretiminin önlenmesi olmakla birlikte, ayrıca kontamine zirai ürünlerin detoksifikasyonu başlıca önem taşımaktadır. OT-A, kızartma-kaynatma-fırlama (bazı dereceler için) gibi en uzun ömürlü gıda proseslerinde aşırı derece olmamakla birlikte stabil bir moleküldür (Krogh ve ark., 1974; Scott, 1996).

Hayvan yemlerindeki OT-A detoksifikasyonu için hipoklorit işlemi (Castegnaro ve ark., 1991), ammonizasyon (Chelkowski ve ark., 1982) ve ısı işlemi (Boudra ve ark., 1995) gibi birçok fiziksel ve kimyasal metod geliştirilmiştir. Fakat bu metodlar, çeşitli başarı dereceleri yönünden karşılaştırıldığında bunların hiçbiri OT-A kontamineli tane ve yemlerin pratik detoksifikasyonu için önerilmemektedir (Scott;1996).

Şimdiye kadar, ozon (McKenzie ve ark., 1997) ve alkalın hidrojen peroksit işlemi (Fouler ve ark., 1994) ve gama radyasyonunu (Refai ve ark., 1996) kapsayan umut verici metodlar önerilmiştir. Alternatif olarak şimdilerde geniş çapta çalışılmaya başlanan biyolojik yaklaşım gibi, mikroplar ve onların enzimleri mikotoksin detoksifikasyonu için ayrıca uygulanabilir (Sweeney ve Dobson, 1998).

Fiziksel ve kimyasal metodlarla, kontamine substratlardan mikotoksinlerin eleminasyonu denemelerinin yanı sıra, mikotoksinleri degrades edebilme yeteneğindeki mikroplar son zamanlarda geniş bir alanda denenmeye başlanmıştır. İnek ve koyunun rumen mikropları (Galtier ve Alvinerie, 1976; Hult ve ark., 1976; Xiao ve ark., 1991) ve sığınların (Madhyastha ve ark., 1992)

başlıca kör barsak ve kalın barsaklarında yaşayan mikropları kapsıyan, memeli gastrointestinal bölgesi mikrobiyal florasının OT-A degrede edici aktiviteleri birçok raporda tanımlanmıştır. Ayrıca insan intestinal mikroflorası OT-A'yı kısmen degrede edebilir (Kiessling ve ark., 1984). Ek olarak, bir rumen bakterisi olan *Butyrivibrio fibrisolvens*'inde bazı oranlarda OT-A'yı detoksifiye ettiği rapor edilmiştir (Westlake ve ark., 1987).

Yapılan bir çalışmada, *Aspergillus* strainlerinin birkaçının OT-A dekompoze edici aktivitesi denenmiştir. OT-A üreticisi olan ve olmayan iki strain denenmiş ve sonuçta OT-A üreticisi olan strainlerin zamanla OT-A'yı, metabolize edebildiği saptanmıştır (Damoglou ve ark., 1984).

Çizelge 2.10 OT-A degradasyon aktiviteleri denen *Aspergillus* strainleri (Varga ve ark., 2000).

Türler	Strain numarası ve orjin	OA degradasyonu
<i>Aspergillus flavus</i>	NRRL 1957	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NRRL 163	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	SZMC 1180	+
<i>Aspergillus fumigatus</i> mut. <i>helvola</i>	NRRL 174	+
<i>Aspergillus fumigatus</i> var. <i>acolumnaris</i>	NRRL 5587	+
<i>Aspergillus ochraceus</i>	FRR 3815	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	SZMC Z1	-

Çizelge 2.10 (devam)

<i>Aspergillus japonicus</i>	JHC 564	(+)
<i>Aspergillus niger</i>	JHC 607	(+)
<i>Aspergillus niger</i>	CBS 120.49	+
<i>Aspergillus versicolor</i>	SZMC 560	-
<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC 513	-

- OT-A degrede edemez, + OT-A'yı tamamen degrede edebilir, (+) OT-A'yı kısmen degrede edebilir.

ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; CBM, Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Chiba, Japan; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands; FRR, CSIRO food Research Culture Collection, North Ryde New South Wales, Australia; FGSC, Fungal Genetics Stock Center, KS, USA; IMI, International Mycological Institute, Egham, Surrey, UK, JHC, J.H. Croft's fungal collection, University of Birmingham, UK; NCAIM, National Collection of Applied and Industrial Microorganisms, Horticultural University, Budapest, Hungary; NHL, National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo, Japan; NRRL, Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, IL, USA; RMF, Rocky Mountain Herbarium, Fungi, University of Wyoming, Laramie, WY, USA; SZMC, Szeged Microbiological Collection, Szeged, Hungary.

3.MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Çalışmamızda mikroorganizma olarak çekirdeksiz kuru üzümlerden izole edilip, tanımlanan Section *Nigri*'ye ait bazı *Aspergillus* türleri kullanılmıştır. Bu türler arasında *A. aculatus*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger* ve *A. tubingensis*'e mensup toplam 47 suş bulunmaktadır.

3.1.2 Besiyerleri

3.1.2.1 YES Agar (Yeast Extract Sucrose Agar)

Yeast	20 g
Sakkaroz	150 g
Agar	20 g
MgSO ₄	0,5 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içerikleri karıştırılıp, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır (Bragulat ve ark., 2001).

3.1.2.2 Malt Extract Agar (Oxoid CM 59)

Malt ekstrakt	30 g
Mikolojik pepton	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

pH=5.4±0.2

Besiyeri içerikleri karıştırılıp, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.2.3 Malt Extract Broth (Oxoid CM 57)

Malt ekstrakt	17 g
Mikolojik pepton	3 g
Distile su	1000 ml

pH=5.4±0.2

Besiyeri içerikleri karıştırılıp, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.3 Standart OT-A

Standart OT-A Sigma'dan sağlanmış (kod no: O-1877). Bu standart *A. ochraceus*'dan elde edilmiş, kristal formda ve kapalı şişede 1 mg'dır.

3.1.3.1 OT-A stok standardı

Standart OT-A 4 ml metanolde çözülerek, 0,25 mg/ml'lik stok çözelti hazırlanmıştır. (250 µg/ml=250 ppm) (Tamsop 3, 2001).

3.1.3.2 OT-A ara standardı

Pipetle 1 ml stok OT-A standardından alınıp 5ml'lik metanole eklenmiş, böylece 50 µg/ml(=50 ppm)'lik bir ara standart elde edilmiştir. Bu standart denemelerde kullanılmıştır (Tamsop 3, 2001).

3.1.4 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) mobil fazı

Asetonitril/Su/Asetik asit (49/49/2 hacim/hacim/hacim) olarak hazırlanmıştır (Rhone Diagnostics Technologia, 1998).

3.1.5 HPLC koşulları

Ayırma oda sıcaklığında yapılmıştır. Mobil fazda Asetonitril/Su/Asetik asit (49:49:2)'dir. Mobil fazı dağıtmak için kullanılan PLC pompası akış hızı dakikada 1 ml'ye ve floresans dedektörü eksitasyon için 333 nm, emisyon için 443 nm'ye ayarlanmıştır. HPLC cihazına enjekte edilen hacim 20 µl, yaklaşık alıkonma zamanı 10 dakika, basınç 9,6 bar ve saptama limiti 0,16 ppb'dir.

3.2 Metod

Potansiyel okratoksijenik küf türleri olan, *A. foetidus*, *A. awamori*, *A. niger*, *A. aculatus*, *A. tubingensis* türlerine ait toplam 14 suşun büyüme eğrileri aşağıda anlatıldığı şekilde çıkarılmıştır.

3.2.1 Siyah sporlu küflerin aktif hale getirilmesi ve saklanması

Çalışmalarımızda kullandığımız siyah sporlu küfler, tüp içerisinde MEA besiyerinde, +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Bu stok küflerden, taze hazırlanmış MEA besiyerine aşılama yapılmış ve 25 °C'de inkübe edilerek

büyümesi sağlanmıştır. Bu şekilde aktif hale getirilen küfler, denemelerde kullanılmıştır.

3.2.2 İnokulum hazırlanması

Aktif haldeki büyümüş olan küflerden, transfer iğnesi ile alınıp 500 ml'lik erlenlerde 100 ml olarak hazırlanmış olan MEA besiyerine aşılama yapılmıştır. Bu erlenler 25 °C'de 5 gün tutulduktan sonra steril distile su ile yüzeyden sporlar alınmış ve Thoma lamında sayım yapılarak inokulum için gerekli spor yoğunluğu saptanmıştır. Gerekliğinde seyreltme yapılarak, büyüme eğrisi için 1×10^6 spor/ml aşılama yapılmıştır.

3.2.3 Büyüme eğrisinin çıkartılması

Büyüme eğrisi çalışmaları 100 ml MEB içeren 250 ml'lik erlenlerde ve üçlü paraleller halinde yapılmıştır. Her bir erlene 1×10^6 spor/ml aşılanmıştır. Bu erlenler 25 °C'lik orbital çalkalayıcıda (G 24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick, USA), 120 rpm'de inkübasyona bırakılmış ve her gün 1 erlen alınarak, vakum pompası yardımı ile sıvı kısmı, önceden darası alınmış olan filtreden süzülerek, filtre kağıdı üzerinde kalan kısım 105 °C'de bir gece kurutulduktan sonra, misellerin kuru ağırlığı saptanmıştır.

3.2.4 Potansiyel okratoksijenik küf türlerinin OT-A üretiminin incelenmesi ve ekstraksiyon metodu

3.2.4.1 OT-A üretimi için kültür ortamına aşılama yapılması

Denemelerde kullanılan YES agarlı besiyeri, petrilere 25'er ml olacak şekilde

dökülüp, donması beklenmiştir. Bu besiyerlerine küfler 3 nokta halinde ekilmiş ve 25 °C'de 3 günlük inkübasyona bırakılmıştır (Bragulat ve ark., 2001).

3.2.4.2 Ekstraksiyon metodu

3 günlük inkübasyon sonunda, petrilerdeki besiyerlerinden 5 mm çapındaki steril bir cam boru ile 3'er adet besi yeri parçası (plug) alınmıştır. Bu parçalar daha önce darası alınmış eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Bu tüpler tekrar tartılıp, agar parçalarının ağırlıkları tespit edildikten sonra, her bir eppendorf tüpü için 1 ml metanol ilave edilmiştir. Bu şekilde 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüpler 8000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra üstte kalan metanol alınıp, 0,45 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek, 20 µl olarak, HPLC'ye enjeksiyon yapılmıştır. HPLC'de okunan değerler aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Bragulat ve ark., 2001).

$$C_{\text{smp}} \times \text{Elusyon} \times S$$

$$\text{Formül: } C(\text{ng/g}) = \frac{\text{---}}{\text{---}}$$

$$F \times \text{wt}$$

C = Konsantrasyon (ppb)= ppb

C_{smp} = HPLC'den okunan "Amount" değeri (ng/ml)

Elusyon = Tüpteki elusyondan sonraki son hacim (ml)

S = Ekstraksiyonda kullanılan solvent hacimi (ml)

F = Kolondan geçen numune hacmi (ml)

wt = Numune ağırlığı (g)

3.2.5 OT-A ekstraksiyon metodunun geri kazanım yüzdesinin (%R) saptanması

Denemelerde üç tekrarlı olarak 25'er ml'lik YES Agar besiyerine 50 ppm'lik stok OT-A solüsyonundan, ml'sinde 100 ppb (50 µl), 125 ppb (62,5 µl) ve 150 ppb (75 µl) olacak şekilde eklenerek 3 gün 25 °C'de bekletildikten sonra ekstraksiyon yapılarak HPLC'de okuma yapılmış ve aşağıdaki formülle %R saptanmıştır.

$$\% R = \frac{Q \times 100}{Q_1}$$

Q = HPLC'de bulunan değer

Q₁ = Besiyerine eklenen miktar

3.2.6 *A. tubingensis* 298-T'nin OT-A üretimine zamanın etkisi

İşlemler 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmıştır, sadece zaman olarak petriyelerden 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. günlerde örnek (agar parçası) alınıp, ekstraksiyon işlemlerinden sonra HPLC'de miktarları ölçülmüştür.

3.2.7 *A. tubingensis* 298-T'nin OT-A üretimine sıcaklığın etkisi

İşlemler 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmıştır, sadece aşılana petriyeler 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 °C olmak üzere farklı sıcaklıklarda inkübe edilerek, inkübasyon periyotları sonunda agar örnekleri alınıp, ekstraksiyon işlemlerinden sonra HPLC'de miktarları ölçülmüştür.

3.2.8 *A. tubingensis* 298-T'nin OT-A üretimine % sakkaroz içeriğinin etkisi

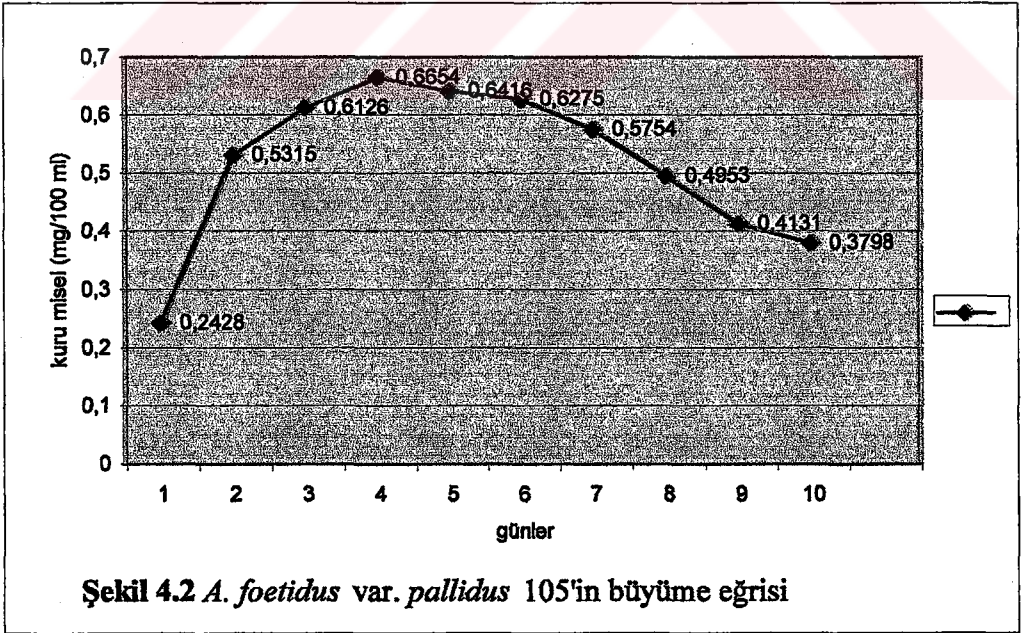
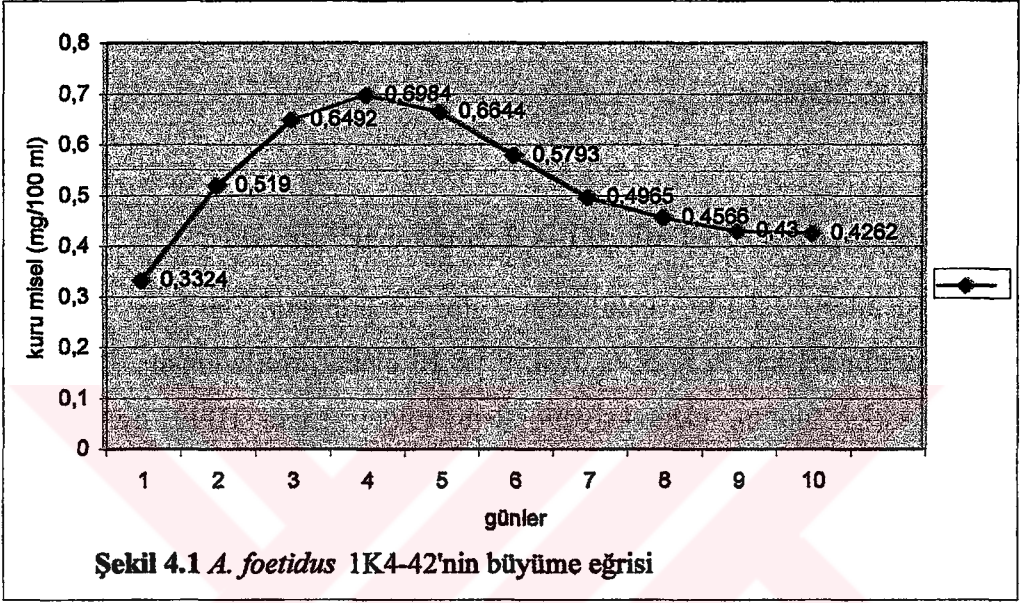
İşlemler 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmış, sadece hazırlanan besiyerlerindeki sakkaroz içeriği % 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra agar örnekleri alınıp, ekstraksiyon işlemlerinden sonra HPLC'de miktarları ölçülmüştür.

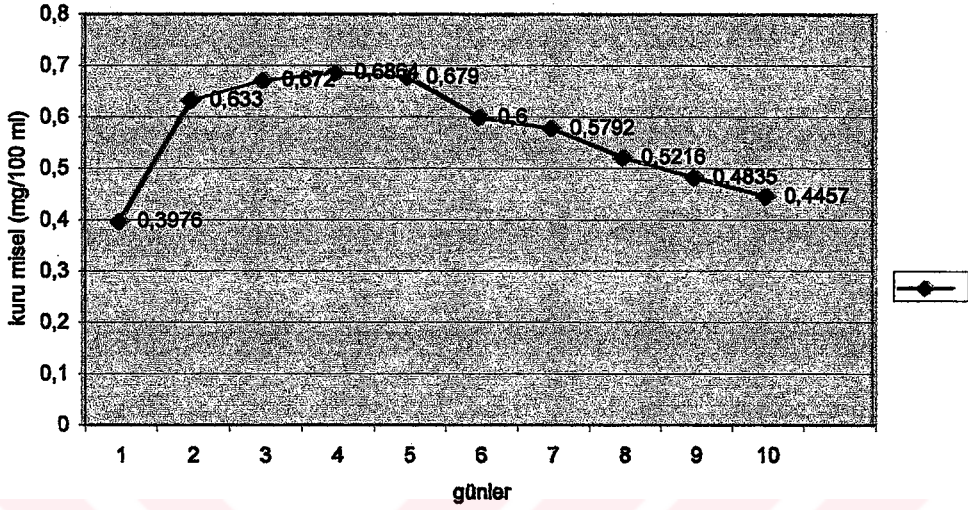
3.2.9 *A. tubingensis* 298-T'nin OT-A üretimine pH'nın etkisi

İşlemler 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmıştır, sadece hazırlanan besiyerlerinin pH'ları 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra agar örnekleri alınıp, ekstraksiyon işlemlerinden sonra HPLC'de miktarları ölçülmüştür.

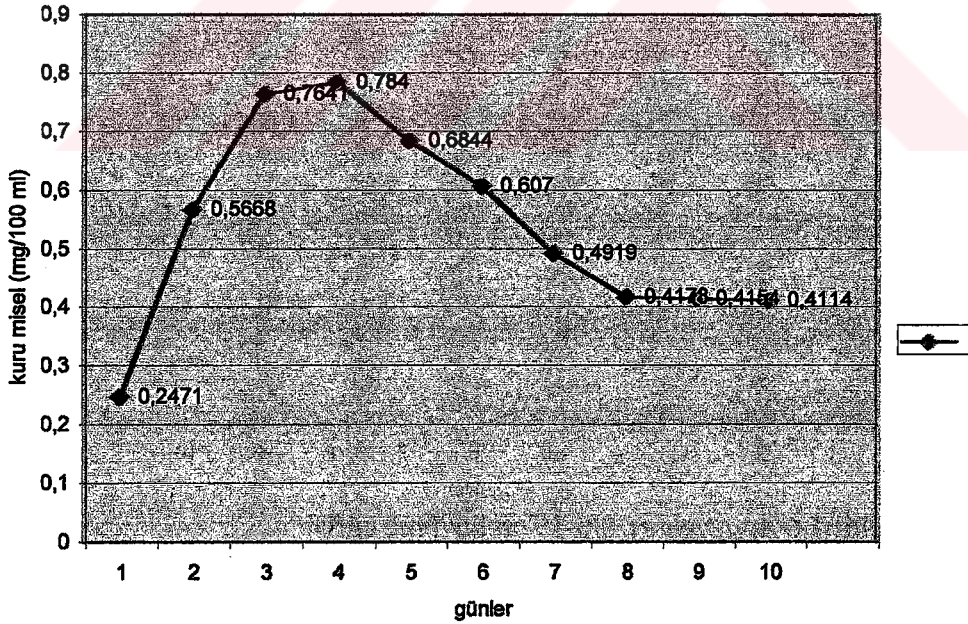
4.BULGULAR

4.1 Büyüme Eğrileri

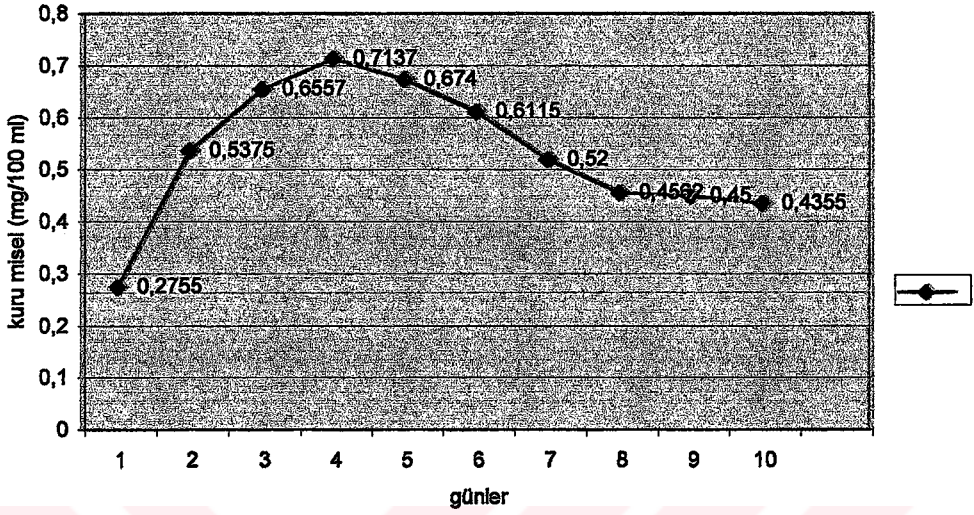




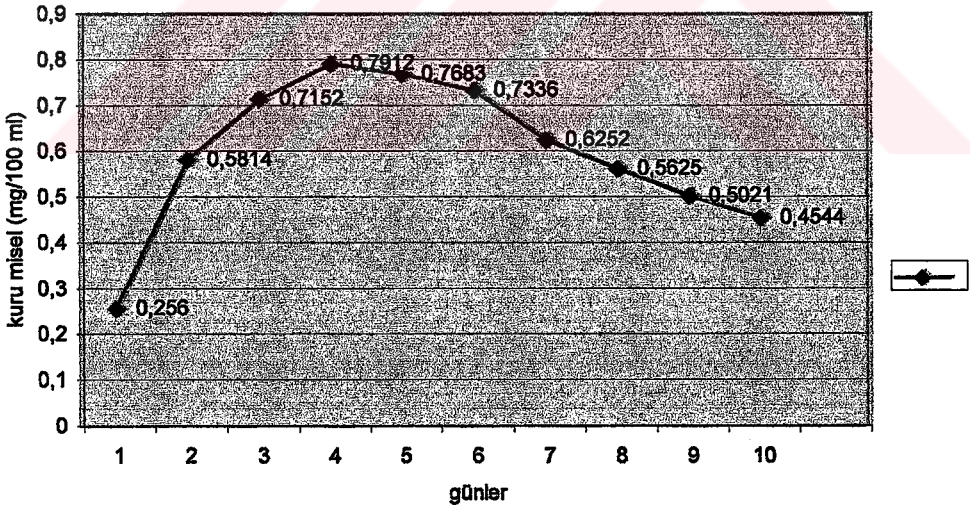
Şekil 4.3 *A. foetidus var pallidus* 359'un büyüme eğrisi



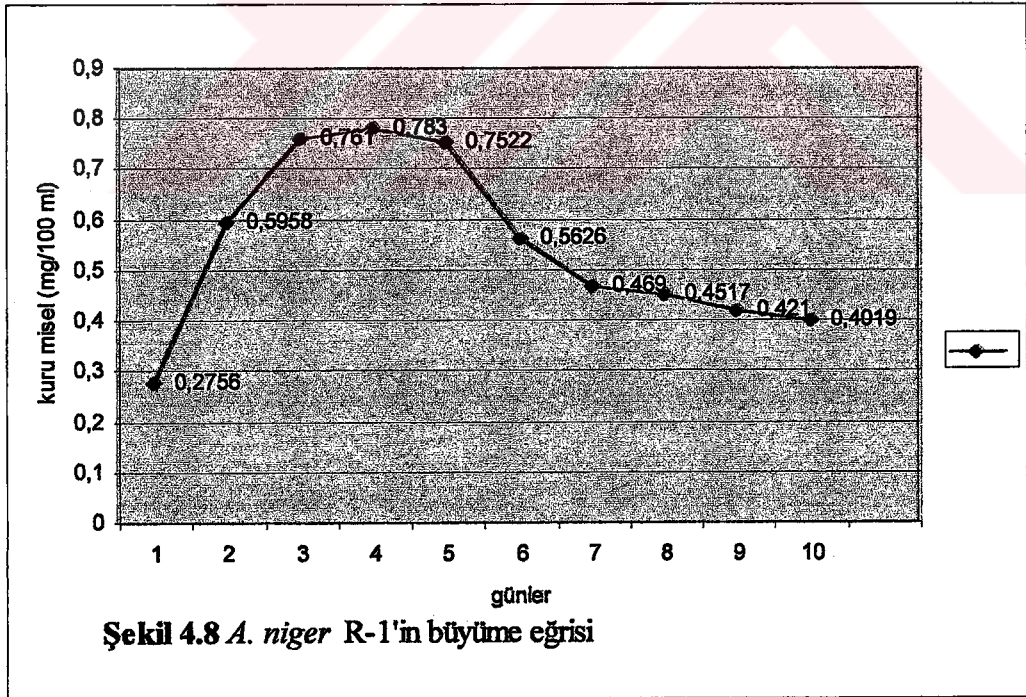
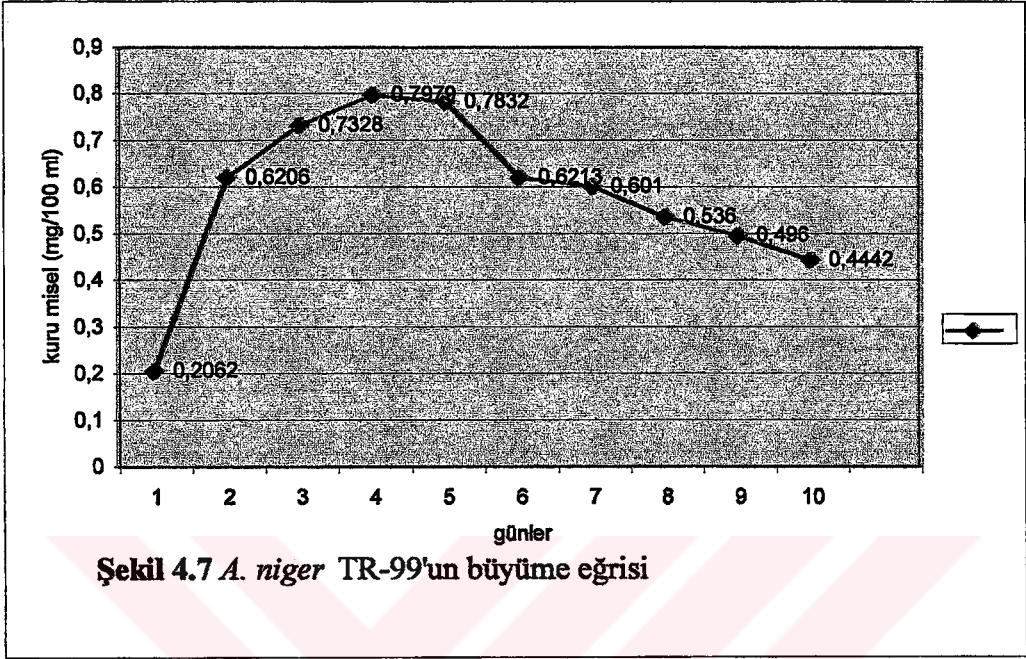
Şekil 4.4 *A. awamori* 1A/4-60'in büyüme eğrisi

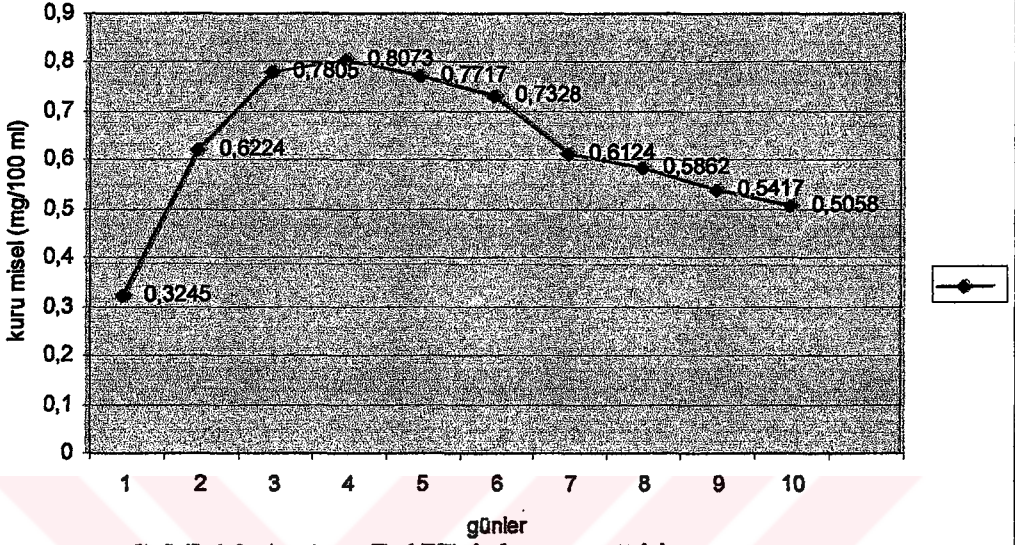


Şekil 4.5 *A. awamori* 8/2-3'ün büyüme eğrisi

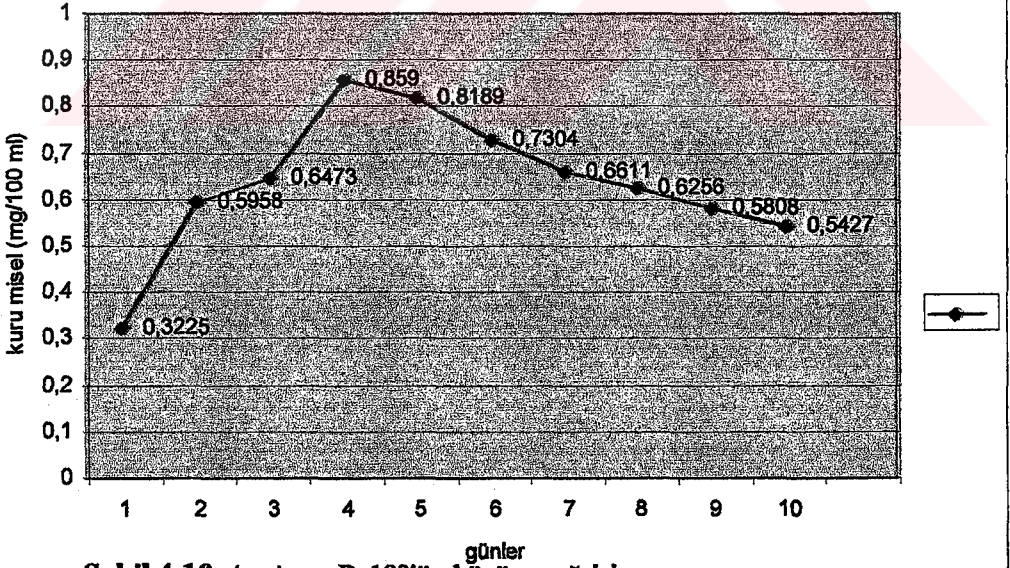


Şekil 4.6 *A. awamori* 8/3-19'un büyüme eğrisi

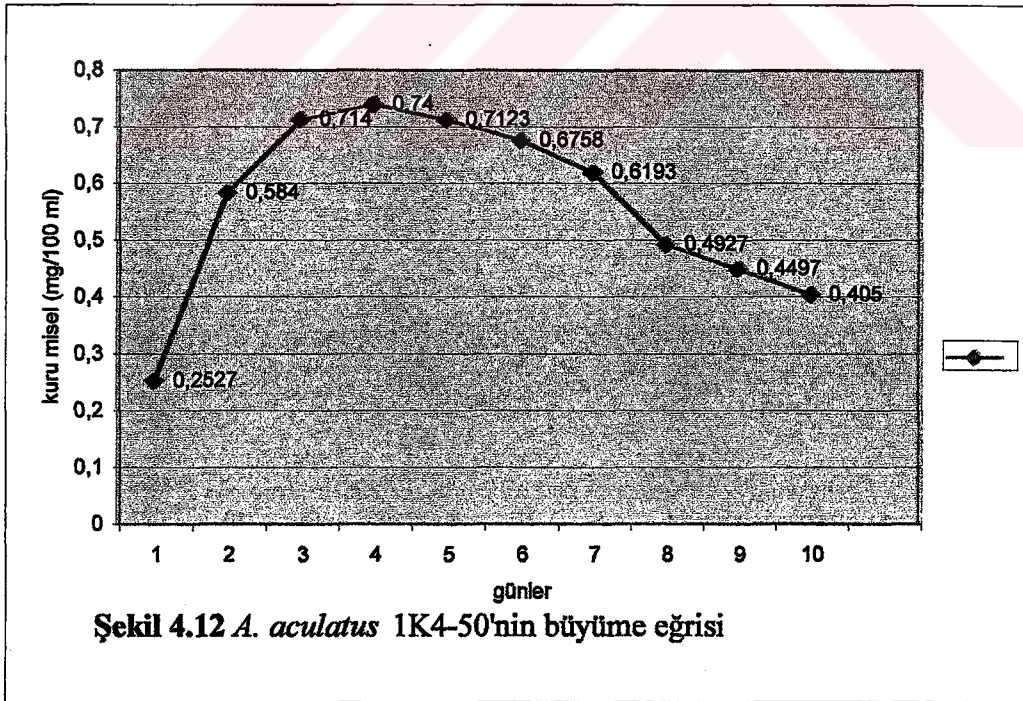
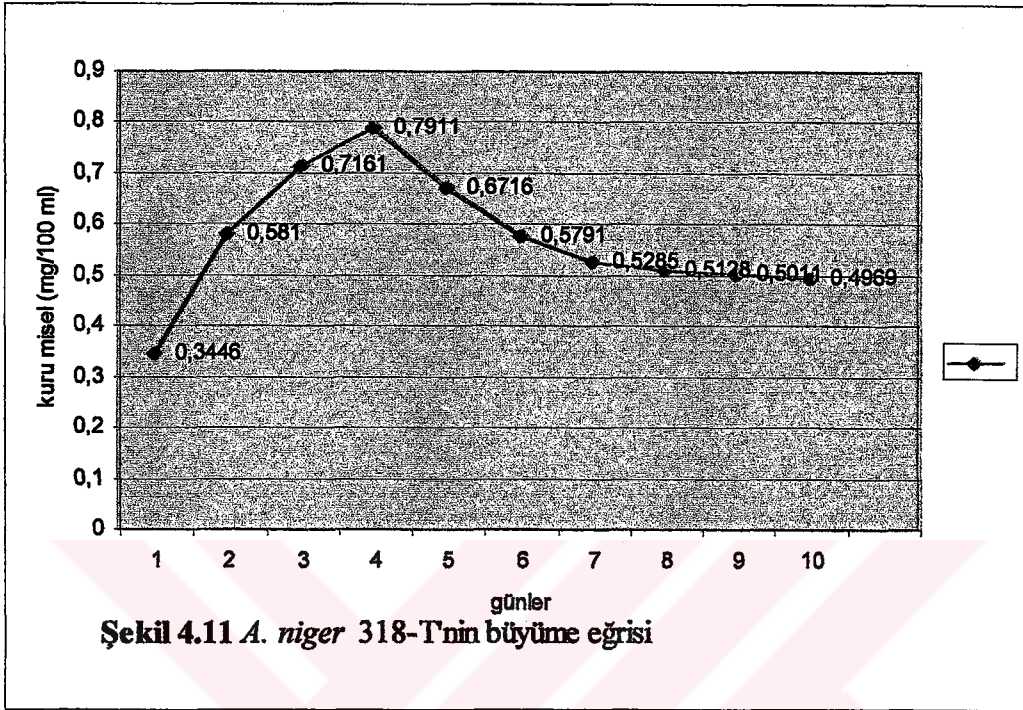


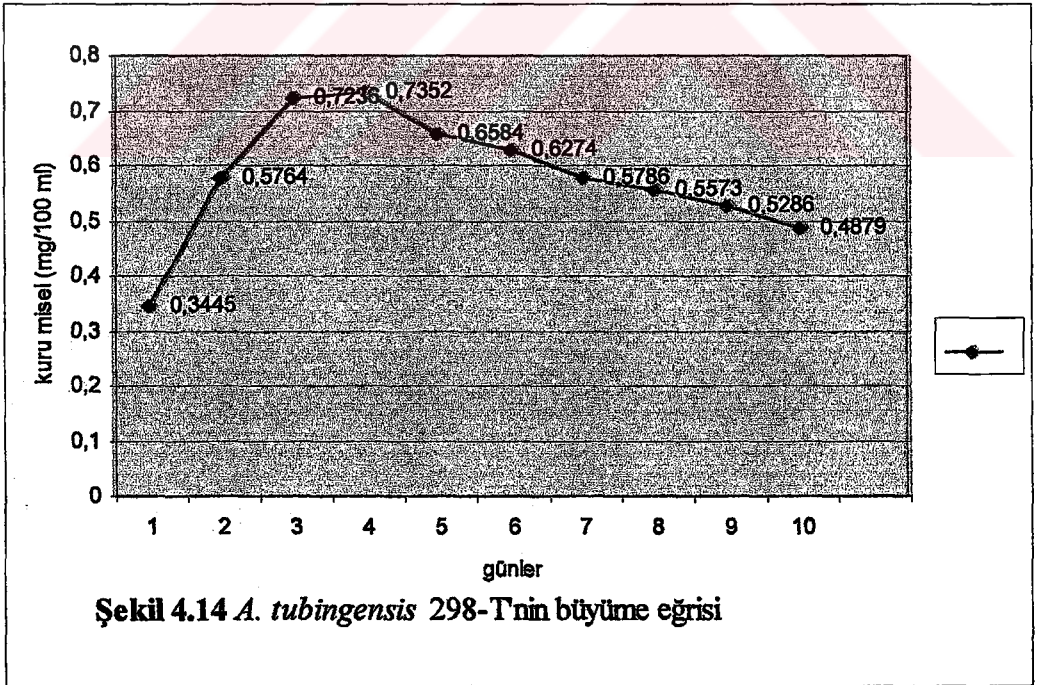
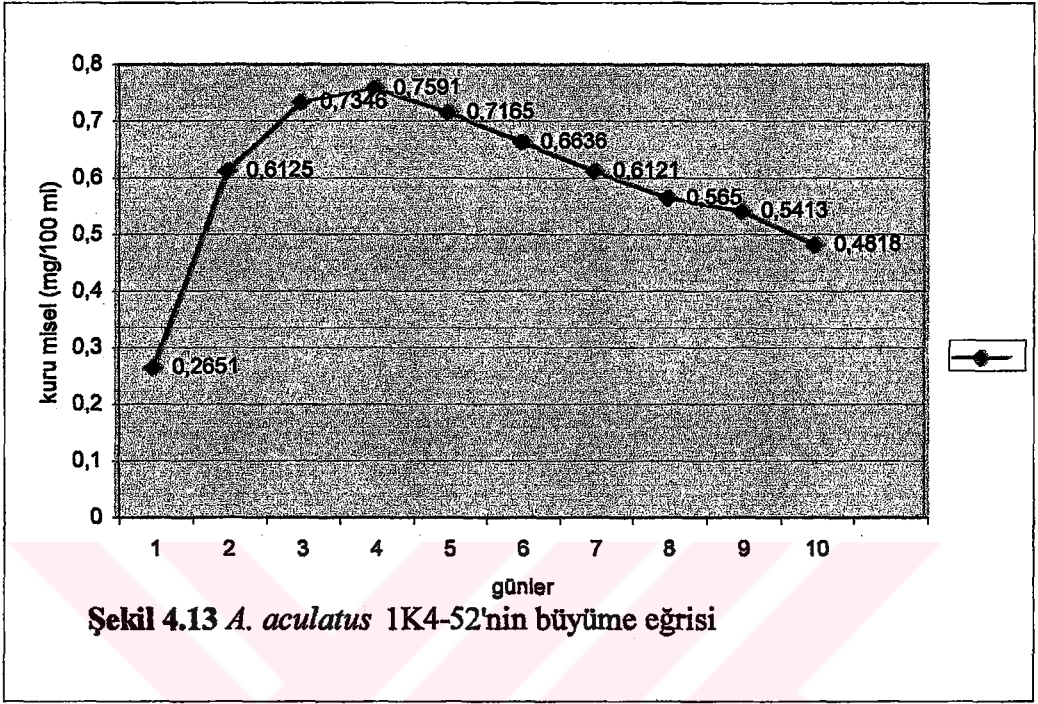


Şekil 4.9 *A. niger* R-177'nin büyüme eğrisi



Şekil 4.10 *A. niger* R-183'ün büyüme eğrisi





4.2 Agar Plug Metodunun Geri Kazanım Yüzdesi (%R)

Denemeler üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama alınmıştır.

Çizelge 4.1 Agar Plug metodunun geri kazanım yüzdesi (%R)

Besiyerine Eklenen	HPLC'de Saptanan	%R
100 ppb/ml	77,2709	77,27
125 ppb/ml	118,7095	94,96
150 ppb/ml	147,89145	98,59

4.3 Siyah Sporlu Küflerin OT-A Üretimleri

Çizelge 4.2 Siyah sporlu küflerin okratoksin-A üretimleri.

Tür	Kod No	Okratoksin-A (ppb)
<i>A. aculatus</i>	1K4-47	6,59
	1K4-50	-
	1K4-52	-
	41	-
	338	-
	342	-
	<i>A. awamori</i>	K-84
K99		11,44
K-235		-
K-323		-
K-401		-
K-734		-
K-834		-
1A/4-60		-
8/2-3		-
8/3-19		-

Çizelge 4.2 (devam)

<i>A. foetidus</i>	1K4-40	-
	1K4-42	7,58
<i>A. foetidus</i> var. <i>pallidus</i>	105	-
	220	5,34
	359	-
<i>A. niger</i>	K-213	-
	K-259	-
	K-267	-
	K-300	-
	K-378	-
	K-391	6,62
	K-395	-
	K-495	-
	K-497	-
	K-515	-
	K-746	10,04
	K-881	4,38
	R-1	-
	R177	-
	R-183	-
TR-99	-	
318-T	-	
<i>A. tubingensis</i>	298-T	15,98
	K-31	8,67
	K-33	-
	K-35	-
	K-36	-
	K-70	-
	K-100	-
	K-104	12,26
K-109	-	

-: saptanamadı

Çizelge 4.3 *A. tubingensis* 298-T'nin OT-A üretimine zamanın etkisi

Gün	Eppendorf	Eppendorf+Plug	Plug	Amount	OT-A (ppb)
3	0,9176	2,0664	1,1488	23,2770705	20,262073
4	0,9012	1,2136	0,3124	6,148036	19,680012
5	0,9344	1,2834	0,3490	-	-
6	0,9237	1,3060	0,3823	-	-
7	0,9281	1,2130	0,2849	-	-
8	0,9205	1,3000	0,3795	-	-
9	0,9032	1,1818	0,3099	-	-
10	0,9350	1,2756	0,3406	-	-

-: saptanamadı

Amount: miktar

Plug: besi yeri parçası

Çizelge 4.4 *A. tubingensis* 298-T'nin OT-A üretimine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık °C	Eppendorf	Eppendorf+Plug	Plug	Amount	OT-A (ppb)
5	0,9166	1,3015	0,3849	-	-
10	0,9277	1,2185	0,2908	-	-
15	0,9016	1,3078	0,4062	-	-
20	0,9027	1,4503	0,5476	5,598353	10,223434

Çizelge 4.4 (devam)

25	0,9118	1,4003	0,4885	10,743617	21,993074
30	0,9074	2,3703	1,4634	32,733410	22,368053
35	0,9066	2,2738	1,3672	4,161243	3,04364241

-: saptanamadı

Amount: Miktar

Plug: besi yeri parçası

Çizelge 4.5 *A. tubingensis* 298-T'nin OT-A üretimine % Sakkaroz'un etkisi

Sukroz %	Eppendorf	Eppendorf+Plug	Plug	Amount	OT-A (ppb)
5	0,9282	1,7981	0,8699	—	—
10	0,9022	2,3609	1,4587	21,8704	14,993076
15	0,9154	2,4839	1,5685	29,805524	19,002565
20	0,9201	2,0956	1,1755	22,920218	19,498271
25	0,9072	1,4477	0,5405	4,324012	8,0000222
30	0,9410	1,8062	0,8652	—	—

-: saptanamadı

Amount: Miktar

Plug: besi yeri parçası

Çizelge 4.6 *A. tubingensis* 298-T'nin OT-A üretimine pH'ın etkisi

pH	Eppendorf	Eppendorf+Plug	Plug	Amount	OT-A (ppb)
3	0,9387	1,2827	0,3440	–	–
4	0,9273	1,9937	1,0664	19,202299	18,006656
5	0,9275	1,7185	0,7910	18,422165	23,289715
6	0,9234	1,4090	0,4856	10,658716	21,949579
7	0,9226	1,2219	0,2993	6,247177	20,872626
8	0,9085	1,1210	0,2125	4,231420	19,912564
9	0,9390	1,2925	0,3535	–	–
10	0,9281	1,2437	0,3146	–	–

–: saptanamadı

Amount: Miktar

Plug: besi yeri parçası

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda öncelikle, çekirdeksiz kuru üzümlerden izole edilip, tanımlanan siyah sporlu potansiyel okratoksijenik küfler olan *Aspergillus foetidus* 1K4-42, *A. foetidus* var. *pallidus* 105, *A. foetidus* var. *pallidus* 359, *A. awamori* 1A/4-60, *A. awamori* 8/2-3, *A. awamori* 8/3-19, *A. niger* TR-99, *A. niger* R-1, *A. niger* R-177, *A. niger* R-183, *A. niger* 318-T, *A. aculatus* 1K4-50, *A. aculatus* 1K4-52, *A. tubingensis* 298-T'nin büyüme eğrileri çıkartılmıştır. Bunun için öncelikli olarak, tüp içerisinde, MEA besiyerinde, +4 °C'de saklanan stok küflerimiz, taze hazırlanmış MEA besiyerine aktarılıp (inokule edilip), 25 °C'de inkübe edilmek suretiyle aktif hale getirilmiş, daha sonra aktif hale gelen bu küflerden bölüm 3.2.2'de belirtildiği şekilde Thoma lamında sayım sonrası inokulum için gerekli spor yoğunluğu 1×10^6 spor/ml olarak saptanmıştır. Büyüme eğrisi çalışmaları, 100 ml MEB içeren 250 ml'lik erlenlerde yapılmış ve her bir erlene daha önce belirlenmiş olan 1×10^6 spor/ml aşılacaktır. Bu erlenler 25 °C'lik orbital çalkalayıcıda 120 rpm'de inkübasyona bırakılmış ve her gün 1 erlen alınarak, vakum pompası ile sıvı kısmı süzülüş, filtre üstünde kalan kısım 105 °C'de 1 gece kurutulduktan sonra, misellerin kuru ağırlığı saptanmış ve buradan hareketle büyüme eğrisi çıkartılmıştır. Büyüme eğrileri çıkartılan küfler, 25 ml'lik YES agarlı besiyerine 3 nokta halinde ekilmiş ve 25°C'de, büyümenin yüksek düzelerle ulaştığı 3. gün sonunda, bölüm 3.2.4'te belirtildiği şekilde 3 adet besiyeri parçası (plug) alınıp, 1ml metanolde 1 saat bekletilmiş, santrifüj ve filtrasyon basamakları sonrası 20 µl olarak HPLC'ye enjeksiyon yapılmış ve okratoksin düzeyleri bu yolla saptanmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar incelendiğinde, en fazla kuru misel ağırlığına *A. niger* R-177'nin 4. günde ulaştığını, büyüme eğrisi çıkarılan bütün suşların çok hızlı bir büyüme gösterdiği ve çoğunlukla 4. günde en üst seviyede kuru misel oluşturulduğu saptanmıştır. Okratoksin-A üretim düzeyleri incelendiğinde ise minimum 4,38, maksimum

15,98 düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Bütün bu bulgular ışığında, *Aspergillus tubingensis* 298-T en yüksek OT-A üretim düzeyi ve çok hızlı bir gelişme göstermesi nedeniyle çalışmamıza uygun bulunmuştur.

Çalışmada, *Aspergillus tubingensis* 298-T'nin üreme ve toksin sentezine zaman, sıcaklık, % sakkaroz içeriği ve pH'nın etkileri denenmiş ve sonuçlar sırasıyla çizelge 4.3, çizelge 4.4, çizelge 4.5 ve çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Zaman yönünden durum incelendiğinde, çizelge 4.3'den de görüldüğü gibi, en yüksek okratoksin miktarı, 3. günde saptanmış, 4. günde ise azalma göstermiş ancak 5. gün ve sonrasında OT-A'ya rastlanamamıştır. Çalışmada denenilen diğer siyah sporlu küflerinde çok hızlı büyüdüğü ve büyümenin yüksek olduğu noktalarda OT-A sentezinde en yüksek olduğu bulunmuştur. OT-A'nın 5. gün ve sonrasında saptanamıyor olmasının nedeni çizelge 2.10'da da belirtildiği gibi bazı siyah sporlu küflerin bir süre sonra ortamdaki OT-A'yı daha az toksik olan α formuna degrade ediyor olması yada OT-A üretmemesi olabilir. Varga ve ark., (2000) çalışmalarında *A. niger* strain CBS 120.49'un OT-A degradasyon kinetiğini sıvı ve katı YES ortamlarında denenmiş ve TLC (Thin Layer Chromatography) analizleri sonucunda görülmüştür ki, OT-A sıvı YES ortamında, nisbeten yavaşça degrade edilmiş ve 7 günlük inkübasyon periyodu içinde okratoksin- α 'ya tamamen dönüştürülmüştür. OT-A katı YES ortamında, 2 gün içinde orjinal miktarının (500 ng/ml) % 20'sinden daha azı azalmış ve 5 gün içinde daha az toksik okratoksin- α 'ya tamamen dönüştürülmüştür. Yapılan TLC ve HPLC analizlerinin her ikisinde göstermiştir ki, OT-A katı ortamlarda sıvı ortamlardakinden daha hızlı detoksifiye edilmektedir. Okratoksin- α katı ortamda 7 gün içinde daha sonra bilinmeyen bir bileşiğe degrade edilmektedir. Bir *Aspergillus niger* straini tarafından gizlenen bir karboksipeptidaz, OT-A'yı okratoksin- α ve fenilalanin'e dekompoze etmektedir. Karboksipeptidaz-A'nın, OT-A'yı okratoksin- α 'ya dönüştürebileceği önceden bulunmuştur (Deberghes ve

ark., 1995). Yine bir diğer çalışmada *A. niger*'in okratoksin- α 'yı, daha sonra bilinmeyen bir bileşiğe degrede ettiği belirtilmiştir (Harwig, 1974). Damoglou ve ark., (1984), çalışmasında OT-A üreticisi olan ve olmayan iki strain denemiş ve sonuçta OT-A üreticisi olan strainlerin zamanla OT-A'yı metabolize edebildiğini saptamıştır. OT-A degrede edici mikroorganizmaların şimdiye kadar OT-A'yı sınırlı toksikliğe sahip okratoksin- α 'ya dönüştürdüğü saptanmıştır (Harwig, 1974). Aşkun, (2002), bazı okratoksijenik küf türlerinde OT-A oluşumunun zamana bağlı değişimini incelediği çalışmasında, *Aspergillus alutaceus* 39539'un büyüme eğrisini belirlemiş ve büyümenin en yüksek olduğu seviyeyi 712 mg'lık kuru misel ağırlığı ile 6. gün olarak saptamıştır. Bizim çalışmamızda ise *A. tubingensis* 298-T'nin en fazla misel ağırlığı, 0.7352 mg ile 4. günde elde edilmiştir. Buda göstermektedir ki, test organizmamız çok hızlı bir büyüme göstermekte ve diğer organizmalara göre daha erken ölüm fazına girmektedir. Aşkun, (2002), aynı çalışmada, katı ve sıvı ortamlarda *A. ochraceus* 37-10'un OT-A üretimini incelemiş ve katı ortamda 5.00 ppb., sıvı ortamda ise en yüksek OT-A üretimini 17. günde 82.7 ng/ml olarak elde etmiştir. Bizde katı ortamda, *A. tubingensis* 298-T ile yaptığımız çalışmamızda maksimum OT-A miktarını 3. günde elde etmiş bulunmaktayız. Maksimum OT-A seviyelerine bu kadar kısa zamanda ulaşılıyor olmasının nedeni, test organizmasının çok hızlı büyüme göstermesi ve özellikle katı bir ortam kullanılması olabilir. Yaptığımız çalışmada özellikle katı ortam kullanma nedenimiz kullandığımız referans metodun, katı ortamdaki örneklemeye olanak sağlaması ve özellikle incelenen literatürlerde OT-A üretimi için katı ortamın elverişliliğinin anlaşılmasından ileri gelmektedir.

Sıcaklık verilerine ait olan çizelge 4.4 incelendiğinde, 20, 25, 30 ve 35 °C'de OT-A'nın saptanmış olduğu, 30 °C'de en üst düzeye ulaştığı, 35 °C'de ani bir düşüşe geçtiği, 20 °C'nin altında ise hiç üretmediği belirlenmiştir. Burada *Aspergillus tubingensis* 298-T'nin optimum büyüme sıcaklığı ve bunun civarında

maksimum düzeyde OT-A sentezlediği , bu sıcaklığın altında yada üstündeki değerlerde OT-A üretiminin azaldığı yada hiç üretmediği anlaşılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, 10 °C'de 28 gün inkübe edilen arpada *A. ochraceus* W CBS 589.68 ve *A. ochraceus* SLV'nin OT-A sentezlemediği ve söz konusu organizmaların üremelerinin 25 °C'ye göre daha az olduğu bildirilmiştir (Hagglom, 1982). Damoglou ve ark., (1984), arpaya inokule edilen *A. ochraceus* IMI132429'un 5 °C'de inkübasyon sonunda sayısında değişme olmadığını ve OT-A sentezlemediği, *P. viridicatum* ATCC 26169'un sayısında ise çok yavaş artış olmakla beraber OT-A ve sitrinin sentezlemediğini bildirmiştir. 10 °C'de inkübasyonda ise *A. ochraceus* IMI 132429'un 32. günde maksimum sayıya ulaştığını, 100. günde OT-A ve sitrinin sentezinin başladığını ve 152. günde maksimum miktarda toksin saptandığını ancak daha sonra toksin miktarlarında azalma olduğunu belirtmişlerdir. 20 °C'de inkübasyonda ise *A. ochraceus* IMI 132429'un 19. günde en fazla olmak üzere ilk 50 günde OT-A sentezlediği, daha sonraki günlerde toksin miktarında azalma olduğu, 177. günde ise hiç toksin saptanamadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar *P. viridicatum* ATCC 26169'un ise 20 °C'de inkübasyonda 169 gün boyunca artan miktarlarda OT-A sentezlediğini 250. günde ise OT-A miktarında azalma olduğunu, sitrininin ise ilk 62 gün boyunca sentezlenmediğini daha sonra sentezin başladığını ve 129. günde maksimum miktarda sitrinin saptandığını ancak üremenin azalmasına paralel olarak bundan sonra toksin miktarının sıfırlandığını belirtmiştir. Ramos ve ark., (1998), *A. ochraceus*'un 3 straini tarafından, arpa taneleri üzerinde okratoksin üretimi, "arpa ekstrakt agar ortamı" ve arpa tanelerinde büyüme üzerine, su aktivitesi, sıcaklık, zaman ve bunların etkileşimlerini araştırdıkları çalışmada, en yüksek okratoksin miktarlarının, *A. ochraceus* strain 3.113 ve strain 3.38 izolatu, için 25 °C'de sırasıyla yaklaşık 12,949 ve 840,5 ppm *A. ochraceus* NRRL 3174 straini için 30 °C'de 8450 ppm olarak bulunmuştur. Bu çalışmada arpa

tanelerinde okratoksin sentezine etki eden tek istatistiksel faktör, izolat faktörüdür. Damoglou ve ark., (1984), yaptıkları çalışmada, *A. ochraceus* IMI 132429'un 0,85'lik su aktivitesinde (%20), otoklavlanmış arpa üzerinde, 10 °C'de çok yavaş büyüdüğünü ve okratoksin üretmediğini, fakat 20 °C'de ise 0,28 µg OT-A/arpa ile maksimum bir üretim gösterdiğini bulmuştur. Karagözlü, (1998), *A. ochraceus* ATCC 22947'nin üremesine ve OT-A sentezine besi yeri başlangıç pH'sı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi gibi faktörlerin etkisini saptamak üzere yaptığı çalışmada, 12 °C inkübasyon sıcaklığının *A. ochraceus* ATCC 22947'nin üreme hızını yavaşlattığı ve 28 °C inkübasyon sıcaklığına göre daha az miktarda biyomass üretimine neden olduğu ayrıca OT-A sentezini ise tamamen engellediği, 4 °C inkübasyon sıcaklığında ise organizmanın ümediği ve dolayısıyla OT-A sentezleyemediğini belirtmiştir. Yapılan bu çalışmalarda göstermektedir ki, sıcaklık OT-A üretimi üzerine oldukça etkili bir faktördür. Düşük ve yüksek sıcaklıklar büyüme ile OT-A üretimini kısıtlamakta veya engellemektedir. Optimum sıcaklıklarda ise maksimum OT-A üretime çok daha erken erişilebilmektedir. Bizim çalışmamızda maksimum OT-A üretime 30 °C'de 3 günlük inkübasyon sonrası ulaşılmıştır. Haggblom, (1982), yaptığı çalışma sonucunda OT-A sentezinde görev alan enzimlerin, primer metabolizmada görev alan enzimlere göre düşük sıcaklığa daha duyarlı oldukları fikrine varmış bu nedenle bizim çalışmamızda 15 °C ve altında toksin saptanamamasının nedeni bu olabilir ayrıca yukarıda açıklanmış olan diğer çalışmalar göz önünde tutulduğunda maksimum OT-A sentezlenen sıcaklığın ve maksimuma ulaşılan derecelerin türlere göre farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.5'te % sakkaroz içeriğinin etkisi incelenmiştir. %5 ve % 30'luk sakkaroz içeriğinde OT-A saptanamazken, en yüksek miktar % 20 sakkaroz içeriğinde saptanmıştır. Burada *Aspergillus tubingensis* 298-T'nin optimum % sakkaroz içeriği ve bunun civarında, OT-A sentezlediği ancak çok düşük yada

çok yüksek seviyelerde sentezleyemediği görülmektedir. Bu durum bize %5'lik sakkaroz içeriğinin OT-A üretimi için yetersiz, % 30'luk sakkaroz içeriğinin ise OT-A sentezini baskılar nitelikte olduğunu düşündürmektedir.

pH yönünden durum incelendiğinde, çizelge 4.6'dada görüldüğü gibi pH 3, 9, 10'da OT-A saptanamamış, en yüksek miktar ise pH 5'te bulunmuştur. Burada çok asidik yada çok bazik pH'ların OT-A sentezini kısıtladığı yada engellediği görülmektedir. Wheeler ve arkadaşları, (1991), *A. ochraceus* FRR 543, 1588, 2360 ve 3032'nin radial gelişimine 25, 30 ve 37 °C inkübasyon sıcaklığının ve pH etkisini araştırdıkları bir çalışmada 25 ve 30 °C'lerin optimum sıcaklıklar olduğunu, asidik pH'ların *A. ochraceus*'ların gelişimine daha uygun olduğunu ve pH 3,5-4,0'ın optimum pH'lar olduklarını ve pH 6'nın üzerindeki değerlerde gelişimin azaldığını belirtmişlerdir. Oysa *Aspergillus tubingensis* 298-T ile yaptığımız çalışmada pH 5-6 optimum değerler iken , pH 9'a kadar OT-A üretimi saptanmıştır.

Karagözlü, (1998), *A. ochraceus* ATCC 22947 ile yaptığı çalışmada, en fazla biyomass ağırlığı ve OT-A'yı başlangıç pH'sı 5,5 olan besiyerinde, 28 °C'de, 14 gün inkübasyon sonunda saptamıştır. pH 6,5 olan besiyerinde de aynı inkübasyon sıcaklığı ve süresi sonunda pH 5,5 olan besiyerinde elde edilen bulguları elde etmiş, pH 4,5'in test organizmasının üremesini ve OT-A sentezini geciktirdiği ve kısıtladığını saptamıştır.

Çalışmamızda kullandığımız metod, fungusların saf kültürlerinde üretilen OT-A'nın, hızlı ve net bir şekilde belirlenmesini sağlamıştır. Bu yöntem çok miktarda doğal substrat yada kültür ortamının kullanıldığı, çözeltileri pahalı olan ve yoğun çalışma gerektiren diğer konvansiyonel yöntemlere göre avantajlıdır. Yöntemin basitliği, çok sayıda fungal izolatin taramasına (screening) ihtiyaç duyulduğunda çok kullanışlı olmaktadır. Diğer bir avantajı ise ekstraktların

berrak ve HPLC kromatogramlarının interferans göstermemesidir (Bragulat ve ark., 2001).

Sonuçlar incelendiğinde çalışmamızda kullandığımız *Aspergillus tubingensis* 298-T'nin %15-20 sakkaroz içeriğinde, pH 5'te, 30 °C'de, 3 günlük inkübasyon sonunda en yüksek düzeyde OT-A ürettiği bu değerlerin üstünde ve altında OT-A üretiminin kısıtlandığı yada engellendiği saptanmıştır.



6.ÖNERİLER

Çalışma sonuçlarımız göstermişti ki, Section *Nigri*'ye ait olan siyah sporlu *Aspergillus* türleri uygun şartlar oluştuğunda çok hızlı bir şekilde gelişme göstererek hemen toksin oluşturmaya başlayabilmektedir. Bu gruptan olan *A. tubingensis* 298-T büyümesi için elverişli olan zaman, sıcaklık, pH ve % sakkaroz içeriğinde en yüksek düzeyde OT-A sentezlemektedir. Buna göre küfler ve onların zararlı toksik etkilerinden korunabilmek amacı ile hammaddeden, son ürüne hatta taşıma ve depolama aşamalarında sürekli kontrol yapılmalı, üretim hattı ve sonrasında koşullar küflerin büyüme sınırları dışında tutularak korunma sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G., Accensi, F. and Gabanes, F., 1994, Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 2650-2652pp.
- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G., Accensi, F. and Gabanes, F., 1997, New Ochratoxigenic Species in the Genus *Aspergillus*, *Journal of Food Protection*, 60(12):1580-1582pp.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., and Cabanes, F.J., 2001, Current Importance of Ochratoxin A-Producing *Aspergillus* spp., *Journal of Food Protection*, 64(6):903-906pp.
- Akyıldız, R., 1977, Küfler ve Mikotoksinler, *Yem Sanayi Dergisi*, 30:2-4.
- Anon, 1997a, MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), Survey of aflatoxins and ochratoxin A in cereals and retail products, Food Surveillance Information Sheets.
- Arda, M., 1980, Mikoloji, A. Ü. Basımevi, Ankara.
- Aşkun, T., 2002, Çekirdeksiz kuru üzümlerden potansiyel okratoksijenik küflerin izolasyonu ve identifikasyonu ile bazı okratoksijenik küflerde okratoksin-A oluşumunun zamana bağlı olarak değişiminin incelenmesi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Balıkesir, 210s.
- Bauer, J. and Garaeis, M., 1987, Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette, *J. Vet. Med. B.*, 34:613-627pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Bragulat M.R., Abarca, M.L. and Cabañes, F.J., 2001,** An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture, *International Journal of Food Microbiology*, 71:139-144pp.
- Breitholtz-Emanuelsson, A.L., Olsen, M., Oskarson, A., Palminger, I. and Hult, K., 1993,** Ochratoxin A in cow's milk and human milk with corresponding human blood samples, *Journal of AOAC International*, 76 (4): 842-846pp.
- Bridge, P.D., Hawksworth, D.L., Kozakiewicz, Z., Onions, A.H.S., Paterson, R.R.M., Sackin, M.J. and Sneath, P.H.A., 1989,** A reappraisal of terverticillate penicillia using biochemical, physiological and morphological features. I. Numerical taxonomy, *J. Gen. Microbiol.*, 135:2941-2966pp.
- Boudra, H., Le Bars, P. and Le Bars, J., 1995,** Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1156-1158pp.
- Bucheli, P., Kanchanomai, C., Meyer, I. and Pittet, A., 2000,** Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying, *J. Agric. Food Chem.*, 48:1358-1362pp.
- Bullerman, L.B., 1979,** Significance of mycotoxins to food safety and human health, *Journal of Food Protection*, 42(1): 65-86pp.
- Bullerman, L.B., 1981,** Public health significance of moulds and mycotoxins fermented dairy products, *Journal of Dairy Science*, 64:2439-2452pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Bullerman, L. B., Schroeder, K.Y. and Pork, K.Y.**, 1984, Formation and Control of Mycotoxins in Food, *J. Food Protection*, 47:637-646.
- Burdaspal, P.A. and Legarda, T. M.**, 1998, Ochratoxin A in roasted and soluble coffees marketed in Spain, *Alimentaria*, 35:103-109pp.
- Burdaspal, P.A. and Legarda, T.M.**, 1999, Ochratoxin A in wines and grape products originated from Spain and other European countries, *Alimentaria*, 36:107-113pp.
- Castegnaro, M., Berek, J., Fremy, J.M., Lafontaine, M., Miraglia, M., Sansone, F.G. and Telling, G.M.**, 1991, Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes: Some Mycotoxins, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Chelack, W.S., Borsa, J., Szekely, J.G., Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A.**, 1991, Variants of *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* (Formerly *Aspergillus ochraceus*) with Altered Ochratoxin A Production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2487-2491pp.
- Chelkowski, J., Szebiotko, K., Golinski, P., Buchowski, M., Godlewska, B., Radomyrska, W. and Wiewiorowska, M.**, 1982, Mycotoxins in cereal grain. 5. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation, *Nahrung*, 26:1-7pp.
- Chelkowski, J., Samson, R.A., Wiewirowska, M. and Godlinski, P.**, 1987, Ochratoxin A Formation by Isolated strains of the Conidial Stage of *Aspergillus glaucus* Link ex Gay (= *Eurotium herbariorum* Wiggers Link ex Gay) from Cereal grains, *Die Nahrung*, 31(4):267-269.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Ciegler, A.**, 1972, Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group, *Can J. Microbiol.*, 18:631-636pp.
- Codex Alimentarius Commission**, 1998, Position Paper on Ochratoxin A, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Food Additives and Contaminants.
- Coker, R.D.**, 1984; Analysis of food contaminants, Gilbert, J. (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Printed Northern Ireland at the Univ. Press (Belfast) Ltd.
- Çetin, I.**, 1990, Avian Aflatoksikozis, *Etlik Vet. Mikrob. Dergisi*, 7(1):161-181.
- Damoglou, A.D., Downey, G.A. and Shannon, W.**, 1984, The production of ochratoxin A and citrinin in barley, *J. Sci. Food Agric.*, 35:395-400pp.
- Deberghes, P. Betbeder, A.M., Boisard, F., Blanc, R., Delaby, J.F., Krivobok, S., Steiman, R., Sigle-Murandi, F. and Creppy, E.E.**, 1995, Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A, *Mycotoxin Res.*, 11:37-47pp.
- Dirheimer, G. and Creppy, E.**, 1991, Mechanism of action of Ochratoxin A, *IARC Sci Publ.*, 115:171-186pp.
- El-Banna, A., Pitt, J.I. and Leistner, L.**, 1987, Production of mycotoxins by *Penicillium* species., *Syst. Appl. Microbiol.*, 10:42-62pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Eltem, R., Sarıgül, N. ve Ateş M.,** 2002 Ege Bölgesindeki çekirdeksiz kuru üzümelerde okratoksin-A oluşumunun incelenmesi. Araştırma Fon Saymanlığı Proje No 96 BİL/021, 70s.
- Frank, H.K.,** 1991, Risk Estimation for Ochratoxin-A in European Countries, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, Castegnaro, M., Pléstina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch, H.(Eds.), International agency for Research on Cancer, 321-325pp.
- Fouler, S.G., Trivedi, A.B. and Kitabatake, N.,** 1994, Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 77:631-637pp.
- Fukal, L.,** 1990, A survey of cereals, cereal products, feedstuffs and porcine kidneys for ochratoxin A by RIA, *Food Additives and Contaminants*, 7(2):253-258pp.
- Fukal, L.,** 1991, Spontaneous occurrence of ochratoxin A residue in Czechoslovak slaughter pigs determined by immunoassay, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 87(10):316-319pp.
- Galtier, P. and Alvinerie, M.,** 1976, In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras, *Ann. Rech. Vet.*, 7:91-98pp.
- Gentles, A., Smith, E.E., Kubena, L.F., Duffus, E., Johnson, P., Thompson, J., Harvey, R.B. and Edrinton, T.S.,** 1999, Toxicological Evaluations of Cyclopiazonic Acid and Ochratoxin A in Broilers, *Poult. Sci.*, 78:1380-1384pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Goto, T.**, 1990, Mycotoxins: current situation, *Food Reviews International*, 6(2):265-290pp.
- Hadidane, R., Bacha, H., Creppy, E.E., Hammami, M., Ellouze, F. and Dirheimer, G.**, 1992, Isolation and Structure determination of naturel analogues of mycotoxin Ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus*, *Toxicology*, 76:233-243pp.
- Hagblom, 1982**, Production of ochratoxin-A in barley by *A. ochraceus* and *P. viridicatum*: Effect of fungal growth, time, temperature and inoculum size, *Applied and Environmental Microbiology*, 43:1205-1207pp.
- Harwig, J.**, 1974, Ochratoxin A and related metabolites, In: Purchase, I.F.H. (Ed.), Mycotoxins, Elsevier, Amsterdam, 345-367pp.
- Harwig, J., Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M.**, 1983, Microbial food toxicants: Ochratoxins, Handbook of food borne diseases of biological origin, Rechcigl, M. (Ed.), 193-238pp, (Scott, 1996a'dan alınmıştır).
- Heenan, C.N., Shaw, K.J. and Pitt, J.I.**, 1998, Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar, *J. Food Mycol.*, 1:67-72pp.
- Hesseltine, C.W., Vandegrift, E.E, Fennell, D.I., Smith, M.L. and Shotwell, O.L.**, 1972, Aspergilli as ochratoxin producers, *Mycologia*, 64:539-550pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Holmberg, T., Breitholtz-Emmanuelsson, A., Häggblom, P., Schwan and Hult, K., 1991, *Penicillium verrucosum* in feed of ochratoxin A positive swine herds, *Mycopathologia*, 116:169-176pp.**
- Horie, Y., 1995, Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*, *Nippon Kingakukai Kaiho*, 36:73-76pp.**
- Hult, K., Teiling, A. and Gatenbeck, S., 1976, Degradation of ochratoxin A by a ruminant, *Appl. Environ. Microbiol.*, 32:443-444pp.**
- Hussein, A.A., Orman, M.A.A. and Nabil, Z.I., 1997, Effect of Acute Administration of Ochratoxin A on the Heartrate, Arterial Blood Pressure and ECG of the rat, *Journal of Natural Toxins*, 6(1):85-102.**
- IARC Anticipated Carcinogens 1976: Ochratoxin A, WHO/IARC, IARC Scientific Publications.**
- IARC (Int. Agency Cancer Research), 1987, WHO/IARC, IARC Scientific Publications, No:7.**
- Int. Agency Cancer Research, 1993, IARC Monographs On The Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occuring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, International Agency for Research on Cancer, Geneva, 489-521pp.**
- Jonsyn, F.E., Maxwell, S.M. and Hendrickse, R.G., 1995, Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone, *Mycopathologia*, 131:121-127pp.**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Jorgensen, K.**, 1998, Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A, *Food Addit. Contam.*, 15-550-554pp.
- Karagözlü, N.**, 1998, Okratoksijenik Küflerin Üremesine ve Okratoksin Sentezine Etki Eden Faktörler ve Bazı Gıdalarda Okratoksin-A Dağılımı Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi, Ege Üniv. Fen Bil. Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Bornova- İzmir, 126s.
- Kaya, S.**, 1989, Yem ve besinlerdeki mikotoksinler : İnsan ve hayvan sağlığı için önemleri, Ankara Üniversitesi, *Vet. Fak. Derg.*, 31:226-253.
- Kaya, S.**, 1990, Veteriner Toksikoloji, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayınları.
- Kaya, S., Yavuz, H. ve Akar, F.**, 1990, Bazı yağlı tohum küspelerinde mikotoksin kalıntıları, Ankara Üniversitesi, *Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 37(1): 173-180.
- Kiessling, K.H., Petterson, H., Sandholm, K. and Olsen, M.**, 1984, Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenon, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:1070-1073pp.
- Kocabey, M.**, 1995, İzmir İli ve Bazı Yem Fabrikalarında Kullanılan Değişik Yem Hammaddelerinde Aflatoksin B₁, Okratoksin-A, Zearelenon İçeriklerinin Saptanması, Ege Üniv. Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 36s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Krivobok, S., Sergie-Murandi, F., Steiman, R. and Creppy, E.E., 1995,** Fungal Flora and Ochratoxin A Production in Various Food and Feed in France, *System Appl. Microbiol*, 18:455-459pp.
- Krogh, P., Hald, B., Giersten, P. and Myken, F., 1974,** Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments, *Appl. Microbiol.*, 28:31-34pp.
- Krogh, P., 1976,** Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy., *Nord. Vet. Med.*, 28:452-458pp.
- Krogh, P., 1978,** Causal associations of mycotoxic nephropathy, *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A. Suppl.*, 296:1-28pp.
- Kuiper-Goodman, T. and Scott, P.M., 1989,** Risk assesment of the mycotoxin ochratoxin A, *Biomed. Environ. Sci.*, 2:179-248pp.
- Legarda, T.M. and Burdaspal, P.A., 1998,** Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y otros países europeos, *Alimentaria*, 35:115-122pp.
- Madhyastha, M.S., Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A., 1992,** Hydrolysis of ochratoxin A by the microbial activity of digesta in the gastrointestinal tract of rats, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 23: 468-472pp.
- Marquardt, R.R., Frohlich, A., Sreemannarayana, O., Abramson, D. and Bernatsky, A., 1988,** Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in western Canada, *Canadian Journal of Veterinerian Research*, 52:186-190pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Marquardt, R.R., Frohlich, A. and Abramson, D.,** 1990, Ochratoxin A: an important western Canadian storage mycotoxin, *Can. J. of Physiol. Pharmacol.*, 68: 991-999pp.
- McKenzie, K.S., Sarr, A.B., Mayura, K., Bailey, R.H., Miller, D.R., Rogers, T.D., Norred, W.P., Voss, K.A., Plattner, R.D., Kubena, L.F. and Phillips, T.D.,** 1997, Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone, *Food Chem. Toxicol.*, 35:807-820pp.
- Micco, C., Miraglia, M., Brera, C., Corneli, S. and Ambruzzi, A.,** 1995, Evaluation of Ochratoxin A Level in Human Milk in Italy, *Food Addit. Contam.*, 12:351-354pp.
- Miraglia, M., Brera, C., Corneli, S. and De Dominicis, R.,** 1993, Ochratoxin A in Italy: status of knowledge and perspectives, Human ochratoxicosis and its pathologies, by Creppy, E.E., Castegnaro, M., Dirheimer, G. (Eds.), (Montrouge, France: John Libbey Eurotext), 129-139pp. (Scott, 1996a'dan alınmıştır).
- Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Christensen, C.M.,** 1980, Mycotoxins, "Advances in cereal science and technology", Pomeranz, Y. (Ed.), A.A.C.C. Inc. st. Poul- Minnesota, USA, 3:159-203pp.
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. and Ueno, Y.,** 1997, Survey of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography, *Food Agric. Immunol.*, 9:77-83pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Northold, M.D and Bullerman, L.D.,** 1982, Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions, *Journal of Food Protection*, 45(6):519-526pp.
- Özkazanç, A.N., Russel-Sin, H., Şanlı, Y. ve Kaya, S.,** 1992, Türkiye'nin değişik bölgelerinde üretilen karma yem ve yem hammaddelerinin mikotoksinlerle kirlenme durumunun incelenmesi, Ankara Üniversitesi, *Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 39 (1-2): 268-290.
- Peraica, M., Radic, B., Licic, A. and Pavlovic, M.,** 1999, Toxic effects of mycotoxins in humans, *Bull. W.H.O.*, 77:754-766pp.
- Pohland, A.E., Nesheim, S. and Friedman, L.,** 1992, Ochratoxin A: A Review (Technical Report), IUPAC, 1029-1046pp.
- Pitt, J.I.,** 1987, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:266-269pp.
- Pitt, J.I. and Leistner, L.,** 1991, Mycotoxins and Animal Foods, Smith, J.E. and Hendersaon, R.S. (Eds.), CRC Press, Inc., London, 81-99pp.
- Pittet, A., Tornare, D., Hugget, A. and Viani, R.,** 1996, Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure, *J. Agric. Food Chem.*, 44:3564-3569pp.
- Pohland, A.E., Nesheim, S. and Friedman, L.,** 1992, Ochratoxin A: A Review (Technical Report) International Union of Pure and Applied Chemistry, 1029-1048pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Pohland, A.E.**, 1993, Mycotoxins in review, *Food Addit. Contam.*, 10:17-28pp.
- Ramos, A.J., Labernia, N., Marín, S., Sanchis, V. and Magan, N.**, 1998, Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains, *International Journal of Food Microbiology*, 44:133-140pp.
- Refai, M.K., Aziz, N.H., El-Far, F. and Hassan, A.A.**, 1996, Detection of ochratoxin produced by *Aspergillus ochraceus* in feedstuffs and its control by γ radiation, *Appl. Radiat. Isot.*, 47:617-621pp.
- Rhone Diagnostics Technologia**, 1998, "Application Note For Analysis of OT-A in Dried Fruit Using Ochrapep" Ref no: A2, VI, 14 p.
- ROC (Report on Carcinogens: Reasonably Anticipated To Be Carcinogen: Ochratoxin A (Cas No. 303-47-9), NTP: National Toxicology Program) Eighth Report on Carcinogens**, 2001.
- Scott, P.M.**, 1996, Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction, *Food Addit. Contam.*, 13 (Suppl.): 19-21pp.
- Silliker, J.H., Elliot, R.P., Baird Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, Jr, J.C. and Roberts, T.A.**, 1980, Microbial Ecology of Foods, Factors Effecting Life and Death of Microorganisms, By the International commission on Microbiological Specifications for Foods, Academic Press, New York, USA, Vol. 1, 79p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Skaug, M. A., 1999, Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A, *Food Addit. Contam.*, 16:75-78pp.**
- Skrinjar, M. and Dimic, G., 1992, Ochratoxigenicity of *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* strains on various media, *Acta Microbiologica Hungarica*, 39(3-4):257-267pp.**
- Smith, J.E. and Moss, M.O., 1985, Mycotoxins, Formation, Analysis and Significance, Willey, Chichester.**
- Soyöz, M. ve Özçelik, N., 2002, Okratoksin-A'nın Toksik Etkileri ve Eliminasyonu, *Türkiye Klinikleri Dergisi*, 22:421-427.**
- Steyn, P.S., 1984, Ochratoxins and related dihydroisocoumarins. "Mycotoxins, production, isolation, separation and purification, Betina, V. (Ed.), Elsevier Science Publishing Company Inc., 183-216pp.**
- Sweeney, M.J. and Dobson, A.D.W., 1998, Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *Int. J. Food Microbiol.*, 43:141-158pp.**
- Şanlı, Y., 1989, Küflenmiş Yem: Kullanımı, tüketimi, sakıncaları, *Çiftlik Derg.*, 62:23-25.**
- Téren, J., Varga J., Hamari Z., Rinyu E., and Kevei, F., 1996, Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains., *Mycopathologia*, 134:171-176pp.**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Téren, J., Palágyi, A. and Varga, J., 1997,** Isolation of ochratoxin producing aspergilli from green coffee beans of different origin, *Cereal Res. Commun.*, 25:303-304pp.
- TAMSOP3, 2001,** "Kuru Meyvelerde Okratoksin-A Saptanması (SOP3)". Tarış Arge M¼d¼rl¼g¼, 1-10.
- Turner, W.B., 1971,** Fungal Metabolites, Academic Pres, London, 120-121pp.
- Turner, W.B. and Aldridge, D.C., 1983,** Fungal metabolites II. Academic Press Ltd., London.
- T¼rk Gıda Kodeks Y¼netmelięi, 2002,** "Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ", T.C. Resmi Gazete, Sayı:24885.
- Ueno, Y., 1987,** Ochratoxins. "Toxicological aspects of foods, Miller, K. (Ed.) ", Elsevier Applied Science Publisers Ltd., 155-163pp.
- Ueno , Y., Kawamura, O., Sugiura, Y., Horiguchi, K., Nakajima, M., Yamamoto, K. and Sato, S., 1991,** Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi, In. Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch, H. (Eds.), Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours, International Agency for Research on Cancer Scientific Publications, Lyon, France,.71-75pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Ueno, Y., Kawamura, O., Sugiura, Y.Y., Horiguchi, K., Nakajima, Y.K. and Sato, S., 1991, Use of Monoclonal Antibodies, Enzyme Linked Immunosorbent Assay and Immunoaffinity Column Chromatography to Determine Ochratoxin-A in Porcine Sera, Coffee Products and Toxin Producing Fungi, IARC- Science Publishers, 115:71-75pp.**
- Ueno, Y., 1998, Residue and risk of ochratoxin A in human plasma and beverages in Japan, *Mycotoxins*, 47:25-32pp.**
- Van Egmond, H.P., 1991, Worldwide Regulations for Ochratoxin-A, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N, Bartsch Lyon, H. (Eds.), International Agency for Research on Cancer, 331-336pp.**
- Van Egmond , H.P. and Speijers, G.J.A., 1994, Survey of data on the incidence and levels of ochratoxin A in food and animal feed worldwide, *Journal of Natural Toxins*, 3(2):125-144pp.**
- Van Egmond, H.P., 1996, Analytical methodology and regulations for ochratoxin A, *Food Additives and Contaminants*, 13(supplement):11-13pp.**
- Varga, J., Teren, J., Hamari, Z., Rinyu, E. and Kevei, F., 1996, Immunochemical Detection of Ochratoxin-A in Black *Aspergillus* Strains, *Mycopathologia*, 134:171-176pp.**
- Varga, J., Rigó, K. and Téren, J., 2000, Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species, *Int. J. of Food Microbiol.*, 59:1-7pp.**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

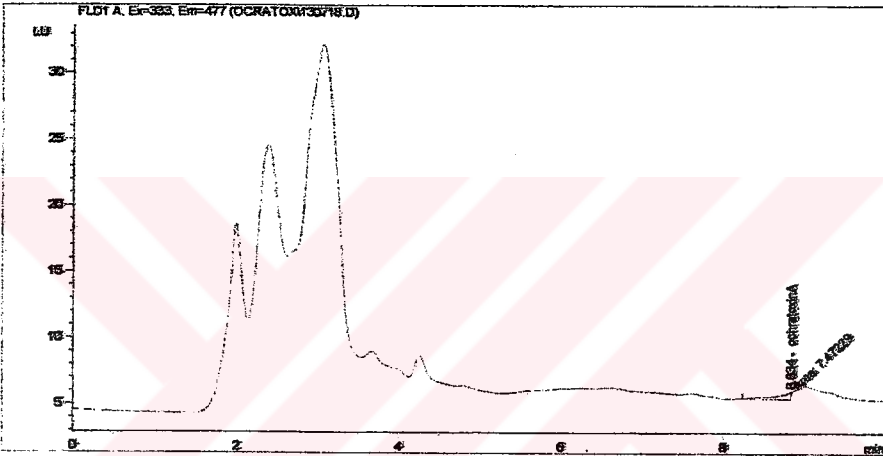
- Visconti, A., Pascale, M. and Centonze, G., 1999,** Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 864:89-101pp.
- Westlake, K., Mackie, R.I. and Dutton, M.F., 1987,** Effects of several mycotoxins on specific growth rate of *Butyrivibrio fibrisolvens* and toxin degradation in vitro, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:613-614pp.
- Wheeler, K.A., Hurdman, B.F. and Pitt, J.I., 1991,** Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, *International Journal of Food Microbiology*, 12:141-150pp.
- Xiao, H., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Phillips, G.D. and Vitti, T.G., 1991,** Effect of hay and a grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep, *J. Anim. Sci.*, 69:3706-3714pp.
- Zimmerli, B. and Dick, R., 1996,** Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assesment, *Food Addit. Contam.*, 13:655-668pp.

EKLER

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\OCRATOK\130718.D

Sample Name: ornek 18

Injection Date : 7/13/04 2:12:23 PM
 Sample Name : ornek 18 Vial : -
 Acq. Operator : BIYONHENDISLIK
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OKRAZ.M
 Last changed : 7/13/04 11:00:13 AM by BIYONHENDISLIK
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OKRAZ.M
 Last changed : 6/7/04 3:23:21 PM by BIYONHENDISLIK
 Okratoksin A2 metodu



ESTD Percent Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Monday, June 07, 2004 3:03:15 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Sample Amount : 20.00000 [ng/ml]

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

RetTime [min]	Type	Area LU	Ant/Area *s	Amount %	Grp	Name
8.834	MM	7.47229	2.87559e-1	10.743617		ochratoxinA

Totals : 10.743617

Results obtained with enhanced integrator!

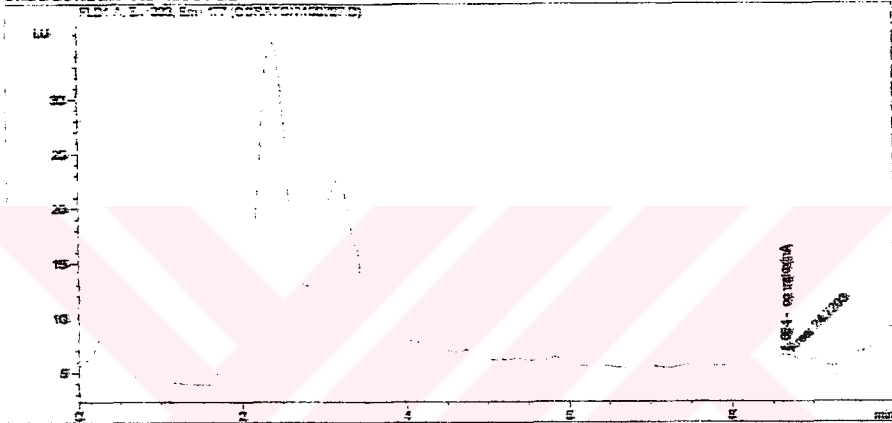
*** End of Report ***

Ek-1 *A. tubingensis* 298-T'nin 25°C'de OT-A üretimi

ata file C:\HPCHEM\1\DATA\OCRATOX\130727.D

Sample Name: ornek 27

Injection Date : 7/13/04 4:16:21 PM
 Sample Name : ornek 27 Vial : -
 Acq. Operator : BIRCHUENDISLIK
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OKRA2.M
 Last changed : 7/13/04 2:26:26 PM by BIRCHUENDISLIK
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OKRA2.M
 Last changed : 6/7/04 3:23:21 PM by BIRCHUENDISLIK
 OKRatoxin A2 method



 ESTD Percent Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Monday, June 07, 2004 3:03:15 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Sample Amount : 20.00000 [ng/ml]

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

RetTime [min]	Type	LU	Area +s	amt/Area	Amount µ	Grp	Name
8.654	MF		24.72026	2.64863e-1	32.737410		ochratoxinA
Totals :					32.737410		

 Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1 7/15/04 11:23:48 AM BIRCHUENDISLIK

Page 1 of 1

Ek-2 *A. tubingensis* 298-T'nin 30°C'de OT-A üretimi

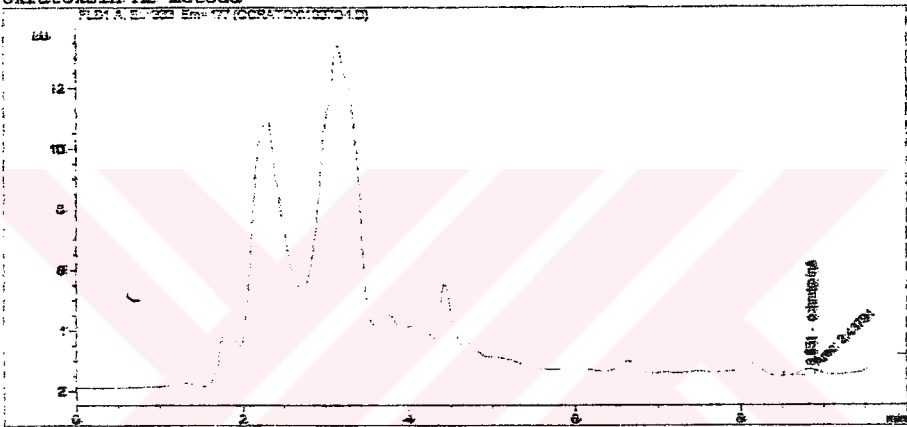
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\OCHRATOX\130704.D

Sample Name: ornek 4

```

Injection Date : 7/13/04 11:09:56 AM
Sample Name    : ornek 4
Acq. Operator  : BIYOMCENDISLIK
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OKRA2.M
Last changed   : 7/13/04 11:00:13 AM by BIYOMCENDISLIK
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OKRA2.M
Last changed   : 6/7/04 3:23:21 PM by BIYOMCENDISLIK
Ochratoxin A2 metodu

```



ESTD Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, June 07, 2004 3:03:15 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 20.00000 [ng/ml]

```

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

RetTime [min]	Type	Area LU	*s	Amt/Area	Amount %	Grp	Name
0.651	MF	2.43731	3.54731e 1	4.324012			ochratoxinA

Totals : 4.324012

Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1 7/15/04 11:28:20 AM BIYOMCENDISLIK

Page 1 of 1

Ek-3 *A. tubingensis* 298-T'nin % 25 sukroz'da OT-A üretimi

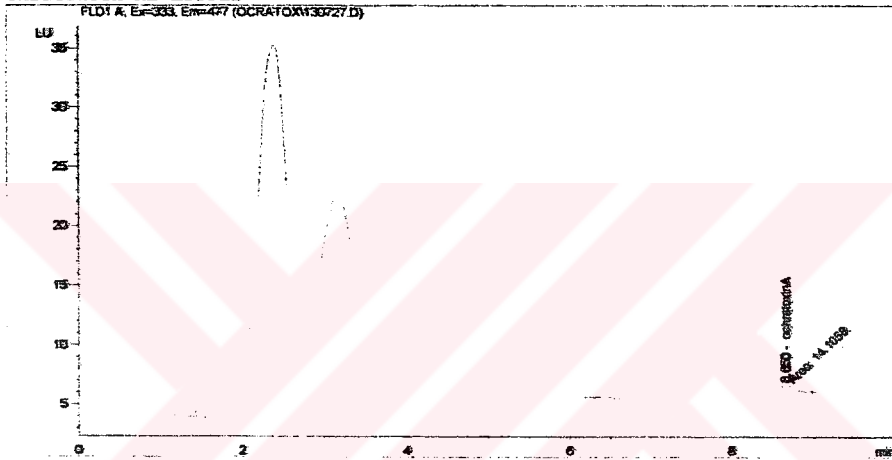
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\OCRATOR\130727.D

Sample Name: ornek 27

```

Injection Date : 7/13/04 4:16:21 PM
Sample Name    : ornek 27
Acq. Operator  : BIYOMÜHENDİSLİK
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OKRA2.M
Last changed   : 7/13/04 2:26:28 PM by BIYOMÜHENDİSLİK
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OKRA2.M
Last changed   : 6/7/04 3:23:21 PM by BIYOMÜHENDİSLİK
Oktratoksin A2 metodu

```



 ESTD Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, June 07, 2004 3:03:15 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 20.00000 [ng/ml]

```

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

RetTime [min]	Type	Area LU	Area *s	Amt/Area	Amount %	Grp	Name
8.650	MM	14.10576	2.72262e-1	19.202299			ochratoxinA

Totals : 19.202299

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 1 7/15/04 11:02:49 AM BIYOMÜHENDİSLİK

Page 1 of 1

Ek-4 *A. tubingensis* 298-T'nin pH 4'te OT-A üretimi

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\OCHRATOX\130728.D

Sample Name: Ozbek 21

Injection Date : 7/13/04 4:29:14 PM
 Sample Name : Ozbek 20 Viial :
 Acq. Operator : BIRCHUMENDISLIK
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCHRAT.M
 Last changed : 7/13/04 2:28:28 PM by BIRCHUMENDISLIK
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCHRAT.M
 Last changed : 6/7/04 3:23:21 PM by BIRCHUMENDISLIK
 Ochratoxin A2 metoda



=====

PCPD Parent Report

=====

Sorted By : Signal
 Calib. Date Modified : Monday, June 07, 2004 3:03:15 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Sample Amount : 20.00000 [ng/ml]

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

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount %	Grp	Name
6.575	MF	13.49396	2.73043e-1	10.422165		ochratoxinA

Totals : 10.422165

Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1 7/15/04 11:25:07 PM BIRCHUMENDISLIK

Page 1 of 1

Ek-5 A. tubigenensis 298-T'nin pH 5'te OT-A üretimi

ÖZGEÇMİŞ

Tuba Ayla Eşder, Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olup, 1979'da İzmir'de doğmuştur. Lise öğrenimini 1996 yılında İzmir'de tamamlamış ve aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünü kazanarak, bölümün Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan 2000 yılında mezun olmuştur. Yüksek lisans eğitimine yine Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda başlamış ve halen özel bir firmanın toplam kalite sağlama teşhis ve analiz laboratuvarında mikrobiyolog olarak çalışmaktadır.

