

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEKİK VE KAKULE ESANSİYEL YAĞLARININ ANTİFUNGAL ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hilal Nur YAVUZ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

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

OCAK 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEKİK VE KAKULE ESANSİYEL YAĞLARININ ANTİFUNGAL ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hilal Nur YAVUZ
(506121514)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

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

OCAK 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506121514 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Hilal Nur YAVUZ**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**KEKİK ve KAKULE ESANSİYEL YAĞLARININ ANTİFUNGAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

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

Jüri Üyeleri : **Yrd. Doç. Dr. Filiz ALTAY**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. İrem OMURTAG KORKMAZ
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : 15 Aralık 2014
Savunma Tarihi : 20 Ocak 2015

ÖNSÖZ

Mikotoksinler insan sağlığını tehdit eden, ürün kaybına neden olan ve ekonomik kayba yol açan önemli bir kontaminanttır. Küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunun engellenerek güvenli gıda sağlanması amacıyla doğal esansiyel yağlar kullanılarak, kuru incirden izole edilen okratoksijenik *Aspergillus carbonarius* izolatlarının gelişmesi ve okratoksin A üretimi incelenmiştir.

Yüksek lisans öğrenim boyunca bana her konuda destek veren ve bu çalışmamın gerçekleştirilmesine yardımcı olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU-GÜLER'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmam sırasında yardımcı olan Ceren DAŞKAYA-DİKMEN ile Sibel ERTUĞRUL'a teşekkür ederim.

Sadece tez değil tüm hayatım boyunca her türlü desteklerini sağlayan ve yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullandığım bitki esansiyel yağlarının teminini sağlayan IFF Aroma Esans Sanayi ve Ticaret A.Ş.(Kocaeli)'ne teşekkür ederim.

Ocak 2015

Hilal Nur YAVUZ
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Esansiyel Yağlar.....	3
2.1.1 Genel özellikleri.....	3
2.1.2 Esansiyel yağların antimikrobiyal özellikleri	3
2.1.2.1 Esansiyel yağların etki mekanizması	4
2.1.2.2 Esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesini etkileyen faktörler.....	7
2.2 <i>Aspergillus carbonarius</i> ve OTA	9
2.2.1 <i>Aspergillus carbonarius</i>	9
2.2.2 Okratoksin A (OTA)	10
3. MATERYAL ve METOT	13
3.1 Materyal	13
3.1.1 <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatları.....	13
3.1.2 Esansiyel yağlar	13
3.1.3 Besiyeri ve çözeltiler.....	13
3.1.4 Okratoksin A analizinde kullanılan çözen ve materyaller	15
3.2 Metot	15
3.2.1 Küf izolatlarının ve spor süspansiyonlarının hazırlanması	15
3.2.2 Disk difüzyon yöntemi.....	15
3.2.3 Kekik ve kakule esansiyel yağlarının antifungal etkisinin araştırılması... ..	16
3.2.4 Küf izolatlarının OTA oluşturma özelliklerinin belirlenmesi.....	17
3.2.4.1 Okratoksin A ekstraksiyonu	17
3.2.4.2 Okratoksin A analizi için HPLC koşulları	17
3.2.4.3 OTA standartlarının hazırlanması	17
3.2.4.4 Geri kazanım oranının belirlenmesi	18
3.3 Hesaplamalar ve İstatistiksel Analiz	18
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	21
4.1 Farklı Esansiyel Yağların <i>Aspergillus carbonarius</i> 'un Gelişimine Etkisi	21
4.2 <i>Aspergillus carbonarius</i> İzolatlarının Gelişimine Kekik ve Kakule Esansiyel Yağlarının Etkisi	23
4.3 <i>A. carbonarius</i> İzolatlarının Kekik ve Kakule Esansiyel Yağları Varlığında Gelişmesinin Baranyi Modeli İle İncelenmesi	29
4.4 <i>Aspergillus carbonarius</i> 'un OTA Üretimine Kekik ve Kakule Esansiyel Yağlarının Etkisi	41

5. SONUÇ ve ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR.....	51
EKLER.....	59
ÖZGEÇMİŞ	71

KISALTMALAR

$\mu_{\max}$	: Maksimum gelişme hızı (mm/gün)
a_w	: Su aktivitesi
BEN	: Balkan Endemik Nefropatisi
CYA	: Czapek Yeast Ekstrakt Agar
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EC	: Avrupa Komisyonu
g	: Gelişme hızı (mm/gün)
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IARC	: Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı
MEA	: Malt Ekstrakt Agar
OTA	: Okratoksin A
PDA	: Potato Dextrose Agar
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
t	: Süre (gün)
TGK	: Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği
y	: Koloni çapı (mm, μm)
y_0	: Başlangıç koloni çapı (genellikle 0 mm olarak alınır)
YES	: Yeast Ekstrakt Sucrose Agar
$y_{\max}$	: Elde edilen maksimum koloni çapı (mm, μm)
λ	: Lag faz süresi (gün)

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Çeşitli esansiyel yağların bazı küfler üzerine antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı literatür çalışmalarından örnekler..	5
Çizelge 3.1 : <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatları.	13
Çizelge 3.2 : CYA besiyeri kimyasal bileşimi	14
Çizelge 3.3 : İz metal çözeltisinin kimyasal bileşimi.	14
Çizelge 3.4 : Czapek çözeltisi kimyasal bileşimi	14
Çizelge 3.5 : Malt ekstrakt agar besiyeri kimyasal bileşimi.	14
Çizelge 3.6 : Tween 80/20 çözeltilerinin kimyasal bileşimi.	15
Çizelge 3.7 : Okratoksin A kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması.	18
Çizelge 4.1 : <i>Aspergillus carbonarius</i> 3904-X4 izolatının gelişimine esansiyel yağların etkisi.	22
Çizelge 4.2 : <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarının gelişiminin % inhibisyonu üzerine kekik esansiyel yağının etkisi.	24
Çizelge 4.3 : <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarının gelişiminin % inhibisyonu üzerine kakule esansiyel yağının etkisi.	25
Çizelge 4.4 : Kekik ve kakule esansiyel yağlarının <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatları için MİK ve MFK değerleri.	26
Çizelge 4.5 : <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarının farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kekik esansiyel yağında Baranyi ile hesaplanan gelişme hızları ve R2 değerleri.	34
Çizelge 4.6 : <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarının farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kakule esansiyel yağında Baranyi ile hesaplanan gelişme hızları ve R2 değerleri	40
Çizelge 4.7 : <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarının OTA üretimine farklı konsantrasyonlarda kekik esansiyel yağının etkisi.	42
Çizelge 4.8 : <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarının OTA üretimine farklı konsantrasyonlarda kakule esansiyel yağının etkisi.	44
Çizelge A.1 : <i>Aspergillus carbonarius</i> 35-03X1 izolatının gelişmesine kekik esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi.	60
Çizelge A.2 : <i>Aspergillus carbonarius</i> 39-04X4 izolatının gelişmesine kekik esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi	60
Çizelge A.3 : <i>Aspergillus carbonarius</i> 57-03D1 izolatının gelişmesine kekik esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi	60
Çizelge A.4 : <i>Aspergillus carbonarius</i> 35-03X1 izolatının gelişmesine kakule esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi	60
Çizelge A.5 : <i>Aspergillus carbonarius</i> 39-04X4 izolatının gelişmesine kakule esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi	60
Çizelge A.6 : <i>Aspergillus carbonarius</i> 57-03D1 izolatının gelişmesine kakule esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi	61

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4.1 : <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarının gelişiminin inhibisyonu üzerine kekik esansiyel yağının etkisi.	25
Şekil 4.2 : <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarının gelişiminin inhibisyonu üzerine kakule esansiyel yağının etkisi.	26
Şekil 4.3 : <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarına karşı kekik esansiyel yağı etkisinin mikroskopta incelenmesi.	28
Şekil 4.4 : Farklı konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/mL}$) kekik esansiyel yağının <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarının (35-03X1,39-04X4, 57-03D1) gelişiminde koloni çapının zamanla değişimi.	31
Şekil 4.5 : 35-03X1 izolatının Baranyi modelinde ve kekik esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri	32
Şekil 4.6 : 39-04X4 izolatının Baranyi modelinde ve kekik esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri	33
Şekil 4.7 : 57-03D1 izolatının Baranyi modelinde ve kekik esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri	34
Şekil 4.8 : Farklı konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/mL}$) kakule esansiyel yağının <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarının (35-03X1,39-04X4, 57-03D1) gelişiminde koloni çapının zamanla değişimi.	36
Şekil 4.9 : 35-03X1 izolatının Baranyi modelinde ve kakule esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri	37
Şekil 4.10 : 39-04X4 izolatının Baranyi modelinde ve kakule esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri	38
Şekil 4.11 : 39-04X4 izolatının Baranyi modelinde ve kakule esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri	39
Şekil 4.12 : Kekik esansiyel yağının ($\mu\text{g/mL}$) <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarına ait OTA miktarları.	43
Şekil 4.13 : Kakule esansiyel yağının ($\mu\text{g/mL}$) <i>Aspergillus carbonarius</i> izolatlarına ait OTA üretim miktarları.	45
Şekil B.1 : 35-03X1 nolu izolatın kontrol örneğinin 7.güne ait kromatogramı.....	62
Şekil B.2 : 35-03X1 nolu izolatın kontrol örneğinin 10.güne ait kromatogramı.....	62
Şekil B.3 : 35-03X1 nolu izolatın kontrol örneğinin 14.güne ait kromatogramı.....	62
Şekil B.4 : 35-03X1 nolu izolatın kekik esansiyel yağı 0,01 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı	63
Şekil B.5 : 35-03X1 nolu izolatın kakule esansiyel yağı 0,3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı	63
Şekil B.6 : 39-04X4 nolu izolatın kontrol örneğinin 7.güne ait kromatogramı.....	63
Şekil B.7 : 39-04X4 nolu izolatın kontrol örneğinin 10.güne ait kromatogramı.....	64
Şekil B.8 : 39-04X4 nolu izolatın kontrol örneğinin 14.güne ait kromatogramı.....	64
Şekil B.9 : 39-04X4 nolu izolatın kakule esansiyel yağı 0,3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı	64
Şekil B.10 : 57-03D1 nolu izolatın kontrol örneğinin 7.güne ait kromatogramı.....	65

Şekil B.11 :	57-03D1 nolu izolatın kontrol örneğinin 10.güne ait kromatogramı.....	65
Şekil B.12 :	57-03D1 nolu izolatın kontrol örneğinin 14.güne ait kromatogramı.....	65
Şekil B.13 :	57-03D1 nolu izolatın kekik esansiyel yağı 0,01 µg/ml konsantrasyonu 10.güne ait kromatogramı.....	66
Şekil B.14 :	57-03D1 nolu izolatın kekik esansiyel yağı 0,01 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.....	66
Şekil B.15 :	57-03D1 nolu izolatın kekik esansiyel yağı 0,03 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.....	66
Şekil B.16 :	57-03D1 nolu izolatın kekik esansiyel yağı 0,06 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.....	67
Şekil B.17 :	57-03D1 nolu izolatın kakule esansiyel yağı 0,3 µg/ml konsantrasyonu 7.güne ait kromatogramı.....	67
Şekil B.18 :	57-03D1 nolu izolatın kakule esansiyel yağı 0,3 µg/ml konsantrasyonu 10.güne ait kromatogramı.....	67
Şekil B.19 :	57-03D1 nolu izolatın kakule esansiyel yağı 0,3 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.....	68
Şekil B.20 :	57-03D1 nolu izolatın kakule esansiyel yağı 0,6 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.....	68
Şekil B.21 :	57-03D1 nolu izolatın kakule esansiyel yağı 0,9 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.....	68
Şekil B.22 :	Okratoksin A kalibrasyon grafiği	69

KEKİK VE KAKULE ESANSİYEL YAĞLARININ ANTİFUNGAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Mikotoksinler, bazı küfler tarafından üretilen gıdalarda yaygın olarak bulunan düşük molekül ağırlıklı ikincil metabolitlerdir. İnsan ve hayvan sağlığını tehdit etmeleri ve ekonomik kayıp meydana getirmeleri bakımından önemlidirler.

Okratoksin A (OTA) *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen önemli bir mikotoksindir. *A. carbonarius*, *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinden olup okratoksin A üreticisi küflerden biridir. Son yıllarda dünya genelinde insan ve hayvan sağlığı için tehlike arz ettiğinden OTA'ya yönelen dikkat artmıştır.

Mikrobiyal kontaminasyonun gıda kaynaklı hastalıklara yol açması ve gıdaların raf ömrünü düşürmesinden dolayı gıda güvenliği açısından önemli bir meseledir. Tüketiciler doğal, fazla işlem görmemiş, en az seviyede kimyasal koruyucu içeren gıda istemektedirler. Esansiyel yağlar doğal olmaları ve toksik olmamalarından dolayı doğal antimikrobiyal maddeler olarak kullanılmaktadırlar. Genel olarak, esansiyel yağlar küflerde misel büyümesini geciktirerek mikotoksin üretimini azaltmaktadırlar.

Yapılan çalışmada Ege Bölgesi'nden toplanan kuru incirlerden izole edilen üç adet *Aspergillus carbonarius* (35-03X1, 39-04X4, 57-03D1) izolatının kekik (0,01; 0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15 µg/mL) ve kakule (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; 2,4; 3 µg/mL) esansiyel yağları ilave edilmiş ortamlarda gelişme ve 7, 10, 14 günlük inkübasyon sürelerinde OTA oluşturma özellikleri 0,97 su aktivitesinde ve 30°C'de araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan kekik ve kakule esansiyel yağları yapılan ön deneme çalışmasında *Aspergillus carbonarius*'a karşı etkileri göz önünde bulundurularak seçilmiştir. İzolatların gelişme hızları Baranyi modeli ile hesaplanmıştır. *A. carbonarius* izolatlarının okratoksin A üretimleri mikotoksin ekstraksiyonu yapıldıktan sonra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir.

A. carbonarius 3904-X4 izolatının gelişimine karşı en yüksek inhibisyon zonlarını kekik ve mercanköşk esansiyel yağları, en düşük inhibisyon zonunu zencefil esansiyel yağı göstermiştir. 2,5 µL kekik ve mercanköşk esansiyel yağı kullanımda *A. carbonarius* 3904-X4 izolatı tamamen inhibe olmuştur.

35-03X1 ve 57-03D1 izolatları 0,09 µg/mL kekik esansiyel yağı konsantrasyonunda tamamen inaktive olurken, 3904-X4 izolatının tamamen inaktivasyonu 0,12 µg/mL konsantrasyonda kekik esansiyel yağı kullanımında gerçekleşmiştir. 35-03X1 ve 57-03D1 izolatları 0,6 µg/mL konsantrasyonda kakule esansiyel yağında tamamen inhibe olurken, 3904-X4 izolatı 0,9 µg/mL kakule esansiyel yağında konsantrasyonda tamamen inhibe olmuştur.

Kekik esansiyel yağı kakuleye göre daha yüksek antifungal etki göstermiştir. En düşük minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) 0,09 µg/mL kekik ve 0,6 µg/mL kakule esansiyel yağı ilavesinde elde edilmiştir. Her iki esansiyel yağ için en yüksek MİK değeri 3904-X4 izolatına karşı belirlenmiştir. Kekik için en yüksek MİK değeri

0,12 µg/mL ve kakule esansiyel yağı için 3,0 µg/mL olarak bulunmuştur. Minimum fungisidal konsantrasyon (MFK), yapılan çalışmada tüm yağlar ve izolatlar için MİK değerlerine eşit olarak belirlenmiştir.

Kontrole göre izolatlar karşılaştırıldığında 0,01 µg/mL kekik esansiyel yağının kullanımında en hızlı gelişmeyi 3904-X4 izolatı göstermiştir. Bu izolatı sırasıyla 57-03D1 ve 35-03X1 izolatları takip etmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre de 3904-X4 ve 57-03D1 izolatlarına karşı 0,01 µg/mL konsantrasyonunda yağ ilavesinin etkisi kontrolle aynı iken 35-03X1 izolatı için kontrolden farklıdır. 3904-X4 ve 57-03D1 kodlu izolatlar için yağın etkisi 0,03 ve daha yüksek konsantrasyonlarda kontrolden farklıdır.

Kakule esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* izolatlarına karşı inhibisyon etkisi kekik esansiyel yağına karşı daha düşüktür. Kakule esansiyel yağı için en düşük gelişme hızı 1,05 mm/gün ile 57-03D1 izolatına karşı 1,2 µg/mL konsantrasyonda yağ kullanımında belirlenmiştir.

57-03D1 izolatı OTA üretimi bakımından kekik ve kakule esansiyel yağına karşı diğer izolatlardan daha dirençlidir. Kekik esansiyel yağı 3904-X4 izolatının OTA üretimi, çalışılan konsantrasyonlarda tamamen engellemiştir. Toksin varlığının belirlendiği durumlarda okratoksin A varlığı kontrole göre % 26,5- 99,83 arasında azalma göstermiştir.

Çalışmada literatür bulgularına benzer olarak 3904-X4 izolatının kekik ve kakule esansiyel yağları bulunan ortamlarda diğer izolatları göre daha iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir.

INVESTIGATION OF ANTIFUNGAL EFFECT OF THYME AND CARDAMOM ESSENTIAL OILS

SUMMARY

Countless pests and diseases threat foods around the world. Most of them are related to pathogenic fungal diseases. Worldwide, post harvest losses have been estimated at 50% because of fungal and bacterial infections. Fungal growth on fresh fruits and vegetables is responsible for food spoilage.

Moulds are immanent biological agents that are able to colonize foods because of their potential to synthesize a wide variety of hydrolytic enzymes. They cause pathologic disorders in plants bringing serious economic losses for food producers. Mould growth depends on factors such as pH, water activity (aw), solute concentration, temperature, atmosphere, time, etc. *Rhizopus*, *Aspergillus* and *Penicillium* species cause reduction of shelf life, decrease of quality and rapid deterioration of fruits and vegetables especially after harvesting. *Aspergillus* species have long been known to be common contaminants of human foods and animal feeds. The occurrence of *Aspergillus* in foods and feeds is dependent on the substrate and environmental factors.

Mycotoxins, low molecular weight secondary metabolites, are produced by various fungi especially genus of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. The primary mycotoxins are aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, fumonisin, and patulin. Mycotoxins are hazardous to human and animal health due to the carcinogenic, mutagenic, teratogenic, lethal effect. Their activity depends on the type of toxin and their concentration in the food. Poor storage and tropical climate are the suitable environmental conditions that support mould growth and mycotoxin production.

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin commonly present in grapes, cereals, species, coffee, cocoa. It is a toxic metabolite produced by several fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, mainly produced by *Penicillium verrucosum*, *P. nordicum*, *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* and *A. carbonarius* under different environmental conditions. Some of the factors that influence growth and production of *Aspergillus* toxins are temperature, pH, moisture, antifungal agents and type of substrate. OTA in cereals is mainly produced by *Penicillium verrucosum* while OTA on grapes, coffee and cocoa is formed by *Aspergillus carbonarius*. Ochratoxin A has been classified as possible human carcinogen by International Agency for Research on Cancer (IARC).

In recent years, consumers' choices are moving towards foods that contain lower levels of chemical preservatives and exhibit more fresh-like and natural characteristics. Traditional medicine, particularly herbal medicines, has increased considerably in both developed and developing countries. Global and national markets for medicinal herbs have been growing rapidly and significant economic incomes are being realized.

Investigations have turned to the study of natural antifungals such as essential oils. Essential oils are aromatic, volatile, natural oily liquids obtained by hydrodistillation from plant material and are usually mixtures of several components. They are easily decomposed, environmentally friendly and non toxic. Their natural antimicrobial activity is commonly related to the chemical structure of their components, the concentration in which they are present, and their interactions, which can affect their bioactive properties. The mechanisms of action essential oils can be explained by changes in permeability of cell membranes, granulation of the cytoplasm and cytoplasmic membrane rupture. Temperature, pH, water activity (a_w), medium conditions and the microorganism involved may influence the stability of the antifungal activities of essential oils.

The aim of this study was to determine the effect of thyme essential oil (0.01; 0.03; 0.06; 0.09; 0.12; 0.15 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and cardamom essential oil (0.3; 0.6; 0.9; 1.2; 1.5; 1.8; 2.1; 2.4; 3 $\mu\text{g} / \text{mL}$) on growth and ochratoxin A production by three isolates (35-03X1, 3904-X4, 57-03D1) of *Aspergillus carbonarius* isolated from dried figs collected from the Aegean region. Thyme and cardamom essential oils were selected against to the effects of *Aspergillus carbonarius*. The plates incubated at 30°C and 0.97 water activity. OTA production was determined after 7, 10 and 14 day of incubation at each value of essential oils and concentrations. The growth of fungi evaluated by daily measurement of the colony diameter (mm). Growth rates were calculated with primary model of Baranyi. OTA detection and quantification carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection after extraction with methanol.

Thyme and origanum essential oils demonstrated the highest inhibition zones and ginger essential oil showed lowest inhibition zones of against development of *A. carbonarius* 3904-X4 isolate. *A. carbonarius* 3904-X4 isolate has been completely inhibited by using 2.5 μL thyme and origanum essential oils.

A. carbonarius 35-03X1 and 57-03D1 isolates completely inactivated 0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ while 3904-X4 isolate inactivated 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of thyme essential oil. Complete inactivation for *A. carbonarius* 35-03X1 and 57-03D1 isolates was provided as 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration of cardamom essential oil. *A. carbonarius* 3904-X4 isolate inactivated at 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration of cardamom essential oil.

Thyme essential oil demonstrated higher antifungal effect than cardamom essential oil. The lowest minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained from 0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ thyme ve 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cardamom essential oils. The highest MIC values were determined for both of them against the *A. carbonarius* 3904-X4 isolates. The highest MIC values for thyme and cardamom essential oils were 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. In this study, the minimum fungicidal concentration (MFC) values were determined as equal to MIC values for all oils and isolates.

According to control, *A. carbonarius* 3904-X4 isolate showed rapid development by using 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ thyme essential oil. This isolate was followed by *A. carbonarius* 35-03X1 and 57-03D1 isolates respectively. The results of statistical analysis, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration thyme essential oil had same effect with control, different effect with 35-03X1 isolate. The effect of thyme essential oil is different from the control at 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and higher concentrations for the *A. carbonarius* 3904-X4 and 57-03D1 isolates.

Inhibitory effect of cardamom essential oil against isolates of *Aspergillus carbonarius* is lower than thyme essential oil. The lowest growth rate for cardamom

essential oil was determined 1.05 mm/day 1.2 µg/mL concentration oil against 57-03D1 isolate.

A. carbonarius 57-03D1 isolate was resistant than other isolates against the thyme and cardamom essential oils of the OTA production. Thyme essential oil was completely prevented OTA production in the studied concentrations. In cases where the presence of toxin, OTA production decreased between 26.5- 99.83 % compared to the control.

In this study 3904-X4 isolate was showed better development than other isolates in the thyme and cardamom essential oils analogously to literature findings.

1. GİRİŞ

Dünyada genelinde çoğunlukla patojenik fungal hastalıklar olmak üzere sayısız zararlı ve hastalık gıdaları tehdit etmektedir. Fungal ve bakteriyel bulaşmalar sonucu görülen hasat sonrası kayıpların %50 olduğu tahmin edilmektedir (Magro ve diğ., 2006). Küfler her yerde bulunabilen, hidrolitik enzim sentezleyerek gıdalara yerleşen biyolojik ajanlardır. Küflerin gelişmeleri pH, su aktivitesi (a_w), çözünebilen madde konsantrasyonu, sıcaklık, atmosfer, süre gibi faktörlere bağlıdır. Özellikle hasat sonrasında *Rhizopus*, *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri sebze ve meyvelerin hızla bozulmasına, raf ömrünün kısılmasına ve kalite kayıplarına yol açarlar (Li ve diğ., 2009; Wanchaitanawong ve diğ., 2005).

Mikotoksinler çeşitli küfler tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı ikincil metabolitlerdir. Özellikle de *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsi küfler tarafından üretilen bu metabolitler insan ve hayvan sağlığını tehdit etmekte ve ekonomik kayba yol açmaktadırlar. Okratoksin A (OTA) *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen yaygın görülen bir mikotoksindir. Tahıllar, üzüm, kahve, baharatlar, kakao gibi gıdalarda OTA'ya sıkça rastlanmaktadır (Amézqueta ve diğ., 2009).

Sentetik fungusitler, mikotoksin problemini çözmek için kullanılsa da insan sağlığını tehdit etmesi ve fungusitlere karşı dirençli türlerin gelişmesine yardımcı olmaları bunların kontrolünde yeni araştırmalar yapılmasını gerektirmiştir. Tüketiciler doğal, çok fazla miktarda işlem görmemiş, en az seviyede kimyasal koruyucu içeren gıda istemektedirler. Son yıllarda çoğu araştırmacı toksik olmamaları nedeniyle esansiyel yağlar gibi doğal antifungallerin araştırılmasına yönelmişlerdir (Mimica-Dukic ve diğ., 2003; Schelz ve diğ., 2006).

Bu çalışmada kuru incirden izole edilen *Aspergillus carbonarius* 'un gelişme ve OTA üretimi üzerine ön denemeler sonucu seçilen kekik ve kakule esansiyel yağlarının antifungal etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 3 adet *Aspergillus carbonarius* izolatının kekik (0,01; 0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15 $\mu\text{g/mL}$) ve kakule

(0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; 2,4; 3 µg/mL) esansiyel yağları ilave edilmiş ortamlarda gelişimi incelenmiştir. Ayrıca 7, 10, 14 günlük inkübasyon sürelerinde OTA oluşturma özellikleri araştırılmıştır. Veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Esansiyel Yağlar

2.1.1 Genel özellikleri

Esansiyel yağlar bitki tohum ve dokularından distilasyonla elde edilen, bitkiye özgü kuvvetli kokulu ve yakıcı lezzetli olan, çok sayıda bileşenden oluşan uçucu yağlardır. Biyoaktif buhar fazına sahip olmaları depolanmış ürünlerin korunmasında önemli bir avantajdır (Singh ve diğ., 2002). Yaklaşık olarak 1500 civarında esansiyel yağ günümüzde bilinmekte ve bunların da yaklaşık 300 tanesinin farklı endüstriler için ticari önemi olduğu belirtilmektedir (Jayasena ve Jo, 2013). Esansiyel yağların bakteri ve küf gibi çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermesi yanında ayrıca aromatik koku özellikleri sebebiyle gıdaların korunmasında ve sakinleştirici, ağrı kesici, antiinflamatuvar olarak da tıpta kullanılırlar (Bakkali ve diğ., 2008). FDA (Food and Drug Administration) tarafından kolay ayrıştırılabilir, çevre dostu olmaları ve fitotoksik olmamaları sebebiyle çoğunluğu GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsünde yer alan esansiyel yağlara karşı son yıllarda artan bir talep vardır (da Cruz Cabral ve diğ., 2013; Holley ve Patel, 2005).

2.1.2 Esansiyel yağların antimikrobiyal özellikleri

Esansiyel yağlar başta monoterpenler, sesquiterpenler ve bunların oksijen türevleri (alkoller, aldehytler, esterler, eterler, ketonlar, fenoller ve oksitler) olan fitokimyasallardır. Timol, eugenol, anethol, mentol, sitral, izotiyosiyanatlar, karvakrol, benzoik asitler, fenolik asitler ve flavonlar gibi fitokimyasallar farklı bakteriyel ve fungal türlere karşı çalışılmaktadır (Souza ve diğ., 2005). Dambolena ve diğ. (2011)'nin *Fusarium moliniforme* tarafından sentezlenen fumonisin B₁ (FB₁) sentezinin önlenmesine yönelik 10 farklı doğal fenolik bileşik ile yaptıkları bir çalışmada ögenol, timol, karvakrol ve izoögenolün en aktif bileşenler oldukları belirtilmiştir. Bu fenolik bileşiklerin ayrıca antifungal aktivitesi de yüksek bulunmuştur. Esansiyel yağların yapılarındaki antimikrobiyal aktivite çoğunlukla bileşenlerinin kimyasal yapısı ve bunların birbirleriyle etkileşimi ile ilişkilidir.

Çoğunlukla fenolik gruba sahip bileşenler antimikrobiyal olarak daha etkilidir (Dorman ve Deans, 2000; Feng ve Zheng, 2007). Ayrıca polifenoller, fenoller ve flavonoidler gibi antioksidan bileşenler antimikrobiyal etki de gösterdiklerinden farklı funguslara karşı etkilidirler (Mihaliak ve diğ., 1991).

Bu konuyla ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda esansiyel yağları test etmek için çoğunlukla *Aspergillus* ve *Fusarium* spp.'leri başta olmak üzere *Penicillium* spp. ve diğer fitopatogenik küfler kullanılmaktadır. Zabka ve diğ. (2009) *Carum carvi*, *Cymbopogon nardus*, *Pelargonium roseum*, *Pimenta dioica* ve *Thymus vulgaris*'den elde ettikleri esansiyel yağların *Fusarium oxysporum*, *F. moliniforme*, *Penicillium expansum*, *P. brevicompactum*, *Aspergillus flavus* ve *A. fumigatus* küflerinin gelişimini engellemede etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada *Aspergillus niger* ve *A. flavus*'a karşı mercanköşk (*Origanum vulgare*), kekik (*Thymus vulgaris*) ve karanfil (*Syzygium aromaticum*) esansiyel yağlarının antifungal potansiyelini belirlenmiştir. Burada en yüksek inhibisyonu mercanköşk yağının gösterdiği ve *A. flavus*'un kekik esansiyel yağına karşı *A. niger*'den daha hassas olduğu bulunmuştur (Viuda-Martos ve diğ., 2007). Silva ve diğ. (2012) kekik esansiyel yağının *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus*'un misel gelişimine etkisini Malt Extract Agar (MEA) besiyerinde 25°C'de 9 gün boyunca incelemişlerdir. Kekik esansiyel yağı *A. parasiticus*'a karşı 5., 7. ve 9. günlerde sırayla 16 mm, 26 mm ve 33 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur .

Çizelge 2.1'de çeşitli esansiyel yağlarının bazı küfler üzerine antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı literatür çalışmalarından örnekler verilmiştir.

2.1.2.1 Esansiyel yağların etki mekanizması

Esansiyel yağların aktivasyon mekanizması tam olarak belirlenememekle birlikte yaygın olan bazı görüşler vardır. Bir görüşe göre esansiyel yağların yapılarındaki hidroksil gruplarının, hidrojen bağlarına dönüşerek enzimleri etkilemesi ve hücre içi fonksiyonlarını değiştirmesi sonucu hücre zarının geçirgenliğinde değişikliğe, sitoplazmada granülasyona, sitoplazmik membranda kopmaya neden oldukları belirtilmektedir. Diğer bir görüşe göre de bazı hidrofobik bileşenlerin, hücre zarının geçirgenliğini değiştirip hücreyi etkileşime açtığı bunun sonucunda proton akışında, hücre pH'sında ve hücrenin kimyasal yapısında değişiklik yaptığı ve böylece

Çizelge 2.1 : Çeşitli esansiyel yağların bazı küfler üzerine antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı literatür çalışmalarından örnekler.

Esansiyel Yağ	Küf Türü	Konsantrasyon	Ortam	Gelişme	MİK ¹	Referans
Kekik (<i>Thymus serpyllum</i> L.)	<i>A. carbonarius</i>		Potato dextrose agar (PDA)	Fungal gelişmeyi önleme	1,25 µl/ mL	Sokolic-Mihalak ve diğ. (2012)
Boldo, poleo, karanfil, anason ve kekik	<i>A. niger aggregate</i> ve <i>A. carbonarius</i>	500 µL/L	Peanut meal extract agar	<i>A. carbonarius</i> : % 52.8 inhibisyon		Passone ve diğ. (2012)
<i>Cuminum cyminum</i> , <i>Ziziphora clinopodioides</i> ve <i>Nigella sativa</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>				<i>C. cyminum</i> : MİK:1,6 mg/mL MFK ² : 3,5 mg/mL	Khosravi ve diğ. (2011)
Mercanköşk	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> ve <i>Aspergillus wentii</i>	2,5 mL/100 mL	Czapek yeast autolysate agar (CYA)	<i>A. carbonarius</i> inhibisyonu: % 95,6		Kocić-Tanackov ve diğ. (2012)
Tarçın, karanfil, anason, kakule	<i>Aspergillus flavus</i>	10 mg/mL		Kakule ve anason esansiyel yağları: antifungal etki yok, Tarçın ve karanfil esansiyel yağları: tamamen fungal gelişmeyi önleme	Tarçın esansiyel yağı MİK: 4 mg/mL, Karanfil esansiyel yağı MİK: 2 mg/mL	AikoMehta (2013)
Fesleğen (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Eurotium amstelodami</i> ve <i>E. chevalieri</i>			<i>E. chevalieri</i> en hassas, <i>A. flavus</i> en dayanıklı		Jakowienko ve diğ. (2011)
<i>Lippia rugosa</i> , <i>Plectranthus glandulosus</i> , <i>Clausena anisata</i> ve <i>Vepris heterophylla</i>					<i>Aspergillus</i> spp.: <i>L. rugosa</i> : 0.5 mg/mL, <i>P.Glandulosus</i> :1.5 mg/mL <i>Fusarium</i> spp.: <i>L. rugosa</i> : 0.3 mg/mL, <i>P.Glandulosus</i> :1.2 mg/mL <i>Penicilium</i> spp.: <i>L. rugosa</i> : 0.6 mg/mL, <i>P.Glandulosus</i> :2.0 mg/mL	Aoudou ve diğ. (2010)

Çizelge 2.1 (devam): Çeşitli esansiyel yağların bazı küfler üzerine antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı literatür çalışmalarından örnekler.

Esansiyel Yağ	Küf Türü	Konsantrasyon	Ortam	Gelişme	MİK	Referans
<i>Origanum vulgare</i> L. (Lamiaceae)	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> ve <i>Fusarium</i> spp.	80 ve 40 µl/mL		Spor oluşumunu engelleme	80- 20 µl/mL	Carmo ve diğ. (2008)
<i>Thymus mastichina</i> L. ssp. <i>mastichina</i>	<i>Aspergillus</i> türleri (<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. fumigatus</i> ve <i>A. niger</i>)				MİK: 1500-2100 µg/mL MFK: 2,0-2,4 mg/mL	Fraternale ve diğ. (2003)
Kekik, tarçın, marigold, spearmint, fesleğen ve quyssum	<i>Fusarium</i> türleri	500-3000 ppm	Potato dextrose agar (PDA)	Kekik esansiyel yağı: fungistatik: 250 ppm, fungisidal: 500 ppm Fesleğen esansiyel yağı: fungistatik: 2000 ppm, fungisidal: 3000 ppm		SolimanBadeaa (2002)
Mercanköşk (<i>Origanum vulgare</i>)	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. ochraceus</i> ve <i>Fusarium moniliforme</i>	1000 ppm	Yeast extract-sucrose (YES) broth	Fungal gelişmeyi tamamen önleme		BasilicoBasilico (1999)
Kakule	<i>Aspergillus ochraceus</i>	% 0,05		<i>A. parasiticus</i> gelişmesini önleme		Badei (1992)

¹MİK: Minumum inhibitör konsantrasyon

²MFK: Minumum fungisidal konsantrasyon

aktivitesini etkilediğini ileri sürülmüştür. Sitoplazmik membranın geçirgenliğinin kaybı genellikle hücrenin ölmesine yol açar. Bunun sonucunda da hücre içi ozmotik basınçta dengesizlik, organellerde bozukluk, sitoplazmik içeriğin sızması ve sonuçta da hücre ölümü görülür (da Cruz Cabral ve diğ., 2013).

Yapılan bir çalışmada *Ageratum conyzoides* esansiyel yağının. *A. flavus*'un gelişiminde hücre duvarı ve sitoplazmasında meydana getirdiği değişimler geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) incelenmiştir (Nogueira ve diğ., 2010). Temel patolojik değişiklik hücre içi sistemde özellikle de hücre zarında ve mitokondiride gözlenmiştir. Hücre zarının düzgünlüğünü kaybettiği ve bazen de hücre duvarından ayrıldığı belirlenmiştir. Fibril katmanlarının zamanla özelliklerini kaybettiği ve inceleyerek hücre duvarından koptuğu ifade edilmiştir.

Rasooli ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda *Thymus eriocalyx* ve *Thymus x-porlock* esansiyel yağlarının *A. niger*'e etkisini TEM ile araştırmışlardır. Organellerde, hücre zarında ve duvarında bazı hasarlar saptanmıştır. Misellerin kekik yağına maruz kalmasıyla hiflerde ve hücre zarında bozulma ve mitokondriyal hasar oluşmuştur. *A. niger*'e karşı 250 ppm *T. x-porlock* esansiyel yağı uygulanmasıyla hücrede katlanma, sitoplazmada azalma, çekirdek zarında hasar ve hücre duvarının bütünlüğünde ve esnekliğinde kayıp gözlenmiştir. Buna göre bu değişiklikler hücre sentezinden sorumlu enzimlere esansiyel yağların müdahalesine bağlanmıştır.

2.1.2.2 Esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesini etkileyen faktörler

Mikrobiyal gelişmenin engellenmesinde çevresel faktörler önemlidir. Sıcaklık, a_w , pH, ortam şartları, farklı bileşenler arasındaki etkileşimler, mikroorganizma türü gibi gelişmeyi etkileyen faktörler esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesini de etkiler. Tarımsal uygulamalar, bitki çeşidi ve işleme farklılıkları bitkilerin antimikrobiyal özelliğini etkiler (Delaquis ve diğ., 2002). Hemen hemen tüm antimikrobiyallerde olduğu gibi genellikle esansiyel yağların da yüksek konsantrasyonlarının daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Ancak burada esansiyel yağın ortam içindeki çözünürlüğü ve difüzyonu önemlidir. Benzer şekilde esansiyel yağa maruz kalma süresinin artmasının antimikrobiyal aktiviteyi de arttıracakı düşünülmektedir. Genel olarak gıdaların pH değeri azaldıkça mikroorganizmaların esansiyel yağlara karşı duyarlılığı artar. Çoğunlukla anaerobik koşullar altında antimikrobiyal aktivitenin arttığı (Seow ve diğ., 2013) ve sıcaklığın etkisinin de

hedef mikroorganizmaların gelişmelerindeki optimum sıcaklığa, kullanılan esansiyel yağa ve ortama bağlı olduğu belirtilmiştir (Friedman ve diğ., 2004). Gram-pozitif mikroorganizmalar esansiyel yağlara karşı daha duyarlıdır. Potasyum sorbat, sodyum benzoat, sodyum bisülfid, karvakrol, sitral, ögenol, timol ve vanilin gibi antimikrobiyaller ile yapılan bir çalışmada antimikrobiyal maddenin konsantrasyonu, a_w , pH ve bunların interaksiyonunun *A. flavus*'un gelişimini önemli düzeyde etkilediği bildirilmiştir (López-Malo ve diğ., 2005).

Yapılan başka bir çalışmada *Equisetum arvense* ve *Stevia rebaudiana* ekstraktlarının farklı konsantrasyonları (%1–3) 0,85–0,95 a_w arasında *Fusarium* ve *Aspergillus*'a etkisi 15–30°C'de 21 gün inkübasyon sonunda incelenmiştir. *E. arvense* ekstraktının % 3'lük konsantrasyonunun tüm şartlar altında gelişmeyi engelleyecek şekilde etkili olduğu, aynı konsantrasyondaki *S. Rebaudiana* ekstraktının ise 0,90–0,93 a_w ve 30 °C hariç gelişmeyi engellediği bildirilmiştir (Garcia ve diğ., 2011). Boldo, poleo, karanfil, anason ve kekik esansiyel yağlarının *A. niger* aggregate ve *A. carbonarius*'un gelişimine etkisi yerfıstığı bazlı besiyerinde farklı a_w 'lerde (0,93; 0,95; 0,98) Passone ve diğ. (2012) tarafından çalışılmıştır. Poleo (2000 µL/L) ve karanfil esansiyel yağlarının (3000 µL/L) sırayla 0,98 ve 0,93 a_w 'de 66.0% ve 80.6% oranında fungal gelişme hızını azalttığı görülmüştür. Boldo, poleo, karanfil esansiyel yağlarının (1000 µL/L) antiokratoksijenik uçucu bileşenlerinin düşük a_w 'lerde etkili olduğu, inhibisyon yüzdelerinin sırayla 0,93; 0,95 ve 0,98 a_w 'lerinde %14.7, 41.7 ve 78.5 olduğu hesaplanmıştır.

Antimikrobiyallerin gıdalara uygulanması oldukça önemlidir. İn vitro çalışmalarda en önemli basamak potansiyel esansiyel yağı belirlemek olurken in vivo uygulamalarda esansiyel yağın aktivitesinin doğrulanması daha önemlidir. Çünkü gıda matrisi biyoaktif bileşenler ile etkileşime girebilir ve bunların etkinliğini azaltabilir. Gıdalara uygulamada ayrıca dikkat edilmesi gereken, esansiyel yağların kullanımıyla organoleptik olarak da kabul edilebilir gıda eldesidir. Esansiyel yağların yüksek konsantrasyonlarda kullanılması sonucu ortaya çıkan istenmeyen organoleptik özellikler, düşük konsantrasyonlarda esansiyel yağ kombinasyonları kullanılarak ortadan kaldırılabilir (Gutierrez ve diğ., 2008).

2.2 *Aspergillus carbonarius* ve OTA

2.2.1 *Aspergillus carbonarius*

Siyah aspergilli olarak bilinen *Aspergillus* section *Nigri* türleri, gıdalarda bozulmaya sebep olur ve dünya genelinde toprak, tahıllar, yem bitkileri, meyve, sebze, kuruyemiş, pamuk, et ve süt ürünleri gibi çok çeşitli yüzeylerde meydana gelebilirler (Gams ve diğ., 1986). Siyah *Aspergillus* türlerinden bazıları organik asitler, hidrolitik enzimler ve fermente içeceklerin ticari olarak üretiminde önemlidirler (Hong ve diğ., 2013; Raper ve Fennell, 1965). Bazı siyah aspergilli türleri okratoksinler (Abarca ve diğ., 2003; Abarca ve diğ., 2004; Cabañes ve diğ., 2002) ve fumonisinler (Frisvad ve diğ., 2011; Frisvad ve diğ., 2007; Perrone ve diğ., 2011) gibi mikotoksinlerin üreticisidir. Kuru üzüm, şarap vb. üzümünden elde edilen ürünlerde karşılaşılan bu mikotoksinler gıda güvenliği ile ilgili endişeleri arttırmaktadır (Logrieco ve diğ., 2009; Logrieco ve diğ., 2010).

A. carbonarius, *A. niger*, *A. acidus*, *A. brasiliensis* ve *A. ibericus* küflerinin siyah aspergilli türleri içinde daha yaygın olduğu belirtilmektedir (Nielsen ve diğ., 2009). *A. carbonarius*'un üzümlerde çürümeye sebep olduğu ilk olarak 1956 yılında Hindistan'da Gupta tarafından bildirilmiştir (Raper ve Fennell, 1965). *A. carbonarius*'un gıdalarda doğal oluşumu tam olarak bilinmemektedir. Siyah aspergillilerin taksonomisi çok açık olmamakla birlikte *A. carbonarius* mikroskopik olarak konidya büyüklüğü ve diziliminden ayırt edilebilmektedir (Kusters-van Someren ve diğ., 1991). *A. niger* aggregate ve *A. carbonarius*'un gelişimi özellikle a_w (0,90–0,99) ve sıcaklık (15–30°C) gibi çevre faktörlerinden belirgin olarak etkilenir (Astoreca ve diğ., 2009; Romero ve diğ., 2007). *A. carbonarius* gelişimine ve OTA üretimine farklı su aktivitesi (0,78-0,99) ve sıcaklığın (15 ve 30°C) etkisi incelenmiştir. Optimum gelişmenin gerçekleştiği sıcaklık 30°C ve bu sıcaklıkta izolatlara göre değişiklik göstererek küf gelişiminin başladığı minimum su aktivitesi değerleri 0,86-0,90 olarak, OTA üretiminin ise 0,86-0,94 su aktivitesi değerlerinde gözlemlendiği belirtilmiştir (Esteban ve diğ., 2006).

A. carbonarius üzüm, baharatlar, kahve, tahıl ve tahıl ürünleri gibi çoğu gıdadan izole edilmektedir (Joosten ve diğ., 2001; Kapetanakou ve diğ., 2011; Nakajima ve diğ., 1997).

Funguslar mikotosin üretiminden sorumlu olup *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin okratoksin A (OTA) üreticisi olduğu ifade edilmektedir. *A. carbonarius* izolatlarının çoğu yüksek oranda okratoksijenik özelliktedir. Bazı araştırmacılar *A. carbonarius*'un tropik ve yarı tropik bölgelerde OTA kaynağı olduğunu belirlemişlerdir (Joosten ve diğ., 2001; Nakajima ve diğ., 1997; Patino ve diğ., 2005; Pitt, 2000).

2.2.2 Okratoksin A (OTA)

Okratoksin A (OTA) *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* ve *Penicillium verrucosum* tarafından üretilen en yaygın mikotoksinlerden biridir. 1965 yılında *Aspergillus ochraceus* izolatlarının ikincil metaboliti olarak keşfedilmiştir. OTA dihidroizokumarine bağlı fenilalenin içeren, renksiz, suda çözünen, UV ışınları altında mavi renk veren bir maddedir (Van der Merwe ve diğ., 1965).

Son yıllarda insan ve hayvan sağlığı için tehlike arz ettiğinden OTA'ya yönelik dikkat dünya genelinde artmıştır. OTA nefrotoksisite, bağışıklık sistemini baskılayıcı, teratojen, kanserojen, bağırsaklarda hassasiyet (Bondy ve Armstrong, 1998; Huff ve diğ., 1980; Lea ve diğ., 1989), karaciğer hücrelerinde sitotoksisite gösterir (Bondy ve Armstrong, 1998). Ayrıca Balkan Endemik Nefropatisi (BEN)'nden sorumludur. OTA konsantrasyonunun BEN hastalarının kanında diğer bölgelerdeki insanların kanına göre 10 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Abouzied ve diğ., 2002). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı OTA'yı renal toksisite, mutajen, teratojen, ve immünotoksik etkileri sebebiyle olası bir insan kanserojeni (grup 2B) olarak sınıflandırmaktadır (IARC, 1993; Pfohl-Leszkowicz ve Manderville, 2007).

OTA tahıllar, üzüm, kahve, baharatlar, kakao ve bunlardan üretilen ürünlerde yaygın olarak bulunmaktadır (Speijers ve van Egmond, 1993). Gıdaların büyük bir çoğunluğunda meydana gelebilir ama kurutulmuş meyvelerde özellikle de incirde ve kuru üzümde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Yapılan bir çalışmada 115 kuru incir örneğinin % 47,8 inde 0.12–15.31 µg/kg konsantrasyonlarında OTA olduğu belirlenmiştir (Karbancıoğlu-Güler ve Heperkan, 2008). OTA kaynağının belirlenmesi için yapılan diğer bir çalışmada 50 kuru incir örneği incelenmiştir. Fungal kontaminasyon %98 oranında olduğu belirlenmiştir. Bütün kontamine

örneklerden Siyah aspergilli izole edilmiştir. Bunların % 98 inde *Aspergillus niger* var. *niger*, % 58'inde *Aspergillus carbonarius* bulunmuştur (Abarca ve diğ., 2003).

Tarlada, hasatta ve depolama sırasında fungal gelişmeyi etkileyen önemli etkenler sıcaklık, a_w ve uygun olmayan şartlar altında kalma süresidir. Mikotoksin sentezi de fiziki, kimyevi ve biyolojik faktörler ve bunların birbirleriyle olan etkileşiminden etkilenir (Abramson, 1987; Astoreca ve diğ., 2007). Şu anda tarladan sofraya kadar olan tüm zincirde ne kadar dikkat edilirse edilsin tamamen OTA inhibisyonu mümkün değildir. Hasat öncesinde önlemler alınması mikotoksin kontaminasyonunu kontrol etmede en iyi yoldur (Amézqueta ve diğ., 2009; Kabak ve Dobson, 2009). Ancak bu aşamadan sonra kontaminasyon oluşursa, OTA tehlikesi hasat sonrası alınabilecek önlemler ile kontrol edilmelidir (Ponsone ve diğ., 2012).

Genel olarak, esansiyel yağların misel büyümesini engellemesiyle mikotoksin üretimini azalttığı gözlenmiştir. Passone ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada 2000 µl/l of boldo esansiyel yağının 6 okratoksijenik *Aspergillus section Nigri* izolatını tamamen inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca 0,93 a_w 'de 1000 µl/L of poleo esansiyel yağı varlığında *A. niger* aggregate ve *A. carbonarius* izolatlarının çoğunda OTA miktarında değişim gözlenmiştir. Bu çalışmada ortam a_w 'sine bakılmaksızın OTA inhibisyonu için düşük miktarlarda esansiyel yağın gerekli olduğu bulunmuştur. Yapılan diğer bir çalışmada kekik esansiyel yağının *A. carbonarius*'un OTA üretimini %90, *A. niger*'in OTA üretimini %68, *A. ochraceus*'un OTA üretimini yaklaşık %75 oranında azalttığını bulmuşlardır (Sokolic-Mihalak ve diğ., 2012). *A. carbonarius*'un gelişiminin önlenmesiyle gıdalarda OTA kontaminasyonda önemli bir azalma olacaktır (Jiang ve diğ., 2014).

Okratoksin A düzeyleri ile ilgili yasal düzenlemeler Türkiye'de ve Avrupa Birliği'nde mevcuttur (EC, 2010; TKG, 2011).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

3.1.1 *Aspergillus carbonarius* izolatları

Tez çalışmasında Ege Bölgesi'nden toplanan kuru incirlerden izole edilen 3 adet *A. carbonarius* izolatı kullanılmıştır (Karbancıoğlu-Güler, 2008). Çalışmada kullanılan izolatlar Çizelge 3.1'de verilmiştir. İzolatlar optimum gelişmeyi 30°C'de 0,97 a_w'de göstermektedir (Elikoğlu, 2013).

Çizelge 3.1 : *Aspergillus carbonarius* izolatları.

No	İzolat	Tür
1	35-03X1	<i>A. carbonarius</i>
2	39-04X4	<i>A. carbonarius</i>
3	57-03D1	<i>A. carbonarius</i>

3.1.2 Esansiyel yağlar

Dereotu (0,912 g/mL), fesleğen (0,956 g/mL), kakule (0,899 g/mL), kekik (0,864 g/mL), kimyon (0,929 g/mL), mercanköşk (0,94 g/mL), rezene (0,951 g/mL), zencefil (0,877 g/mL) esansiyel yağları IFF (International Flavors and Fragrance INC) Aroma Esans Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Gebze-Kocaeli) firmasından temin edilmiştir. Esansiyel yağlar orjinal ambalajları içinde 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3 Besiyeri ve çözeltiler

Küf süspansiyonlarının hazırlanmasında malt ekstrakt agar (MEA-Merck 1,05398) ve %0,5'lik Tween 80 çözeltisi, gelişimin gözlenmesinde %1'lik Tween 20 çözeltisi, esansiyel yağların seyreltilmesinde dimetil sülfoksit (DMSO) ve czapek yeast extract agar (CYA) besiyeri kullanılmıştır. İzolatlar CYA besiyerine inoküle edilmiş ve analizler gerçekleştirilmiştir. Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin kimyasal

bileşimine ait formüller Çizelge 3.2-3.6 'da gösterilmiştir. Besiyeri ve Tween 80/20 çözeltisi 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Çizelge 3.2 : CYA besiyerinin kimyasal bileşimi.

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

Çizelge 3.3 : İz metal çözeltisinin kimyasal bileşimi.

İz metal çözeltisi	Miktar
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 g
Distile su	100 mL

Çizelge 3.4 : Czapek çözeltisi kimyasal bileşimi.

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

Çizelge 3.5 : Malt ekstrakt agar besiyeri kimyasal bileşimi.

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

Çizelge 3.6 : Tween 80/20 çözeltilerinin kimyasal bileşimi.

Tween 80 çözeltisi	Miktar
NaCl	8,5 g
Pepton	1 g
Tween 80/20	1 g
Distile su	1 L

3.1.4 Okratoksin A analizinde kullanılan çözgen ve materyaller

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

3.2 Metot

3.2.1 Küf izolatlarının ve spor süspansiyonlarının hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan küf izolatları MEA besiyerine aşıl原因arak 25°C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda %0,5’lik Tween 80 çözeltisi kullanılarak küf izolatlarının $1-4 \times 10^6$ adet/mL konsantrasyonunda spor süspansiyonları hazırlanmıştır.

3.2.2 Disk difüzyon yöntemi

Esansiyel yağların *A. carbonarius* 39-04X4 izolatı üzerine antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir (Maruzzella ve Liguori, 1958). Hazırlanan spor süspansiyonundan MEA besiyeri üzerine 100 µL yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Test edilecek yağlar (dereotu, fesleğen, kakule, kekik, kimyon, mercanköşk, rezene, zencefil) farklı miktarlarda (2,5; 5; 10; 20; 40 µL), farklı seyreltmelerde (1:5, 1:10, 1:20) ve farklı konsantrasyonlarda besiyeri üzerine yerleştirilen kağıt disklere (6 mm çaplı) emdirilmiştir. Petriler 30°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda etki çapı ölçülmüştür. Deneysel çalışma 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre çalışmanın ikinci kısmında kullanılacak yağlar belirlenmiştir.

3.2.3 Kekik ve kakule esansiyel yağlarının antifungal etkisinin araştırılması

Ön denemelerde yüksek ve düşük antifungal etki gösteren kekik ve kakule esansiyel yağları çalışmanın ikinci kısmında kullanılmıştır. Kekik ve kakule esansiyel yağlarının antifungal etkilerinin belirlenmesinde agar dilüsyon metodu kullanılmıştır (de Billerbeck ve diğ., 2001). İzolatlar için Elikoğlu (2013) tarafından belirlenmiş optimum gelişme sıcaklığı ve su aktivitesinde antifungal etkiler değerlendirilmiştir. Gliserol ile su aktivitesi 0,97 a_w ' ye ayarlanan CYA besiyerine %1 Tween 20 ve sterilizasyon sonrasında kakule ve kekik esansiyel yağları ilave edilmiştir. Çalışmada, besiyerinde kekik esansiyel yağının konsantrasyonu 0,01; 0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15 $\mu\text{g/mL}$, kakule esansiyel yağ konsantrasyonu 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; 2,4; 3 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde esansiyel yağ ilavesi yapılmıştır. Hazırlanan spor süspansiyonundan 1 μL alınarak *A. carbonarius* izolatları esansiyel yağ içeren CYA besiyerine ekilmiştir. Kontrol olarak esansiyel yağ ilave edilmemiş besiyeri kullanılmıştır. Petriler streç film ile kapatılmış ve 30°C'de 14 güne kadar inkübasyona bırakılmıştır. Deneysel çalışma 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Kekik ve kakule esansiyel yağlarının küf gelişimi üzerine etkisi koloni çaplarının 14 gün boyunca günlük olarak iki açıdan ölçülmesi ile belirlenmiştir. İnhibisyon oranı denklem 3.1'deki gibi hesaplanmıştır. Burada I inhibisyon (%), C kontrol petrisindeki gelişme çapı (cm) ve T test petrisinin gelişme çapı (cm)'dir (Pandey ve diğ., 1982).

$$(\%)I = (C - T)/C \times 100 \quad (3.1)$$

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) mikrobiyal gelişmenin olmadığı en düşük konsantrasyonu, minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) fungal gelişimin olmadığı en düşük konsantrasyonu ifade etmektedir. MİK değeri 14 gün inkübasyon sonunda gelişmenin gözlenmediği en yüksek konsantrasyon olarak belirlenmiştir. MFK tayini için 14 günlük inkübasyon sonunda petrilerin çevresindeki streç film çıkarılmıştır. Küf gelişmesinin görülmediği petrilere küf sporları esansiyel yağ içermeyen CYA besiyerine aktararak 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda gelişme gözlenmeyen en yüksek konsantrasyon MFK değeri olarak belirlenmiştir (Kocić-Tanackov ve diğ., 2012).

3.2.4 Küf izolatlarının OTA oluşturma özelliklerinin belirlenmesi

Bu kapsamda kuru incirden izole edilen *Aspergillus carbonarius* izolatlarının okratoksin A oluşturma özellikleri ve okratoksin A oluşumuna farklı esansiyel yağ ve bunların konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda kekik (0,01; 0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15 µg /mL) ve kakule (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; 2,4; 3 µg /mL) esansiyel yağları içeren besiyerlerine izolatlar aşılanarak 7., 10. ve 14. günlerde okratoksin A oluşturma özellikleri mikotoksin ekstraksiyonu gerçekleştirildikten sonra HPLC ile incelenmiştir.

3.2.4.1 Okratoksin A ekstraksiyonu

Okratoksin A ekstraksiyonu Bragulat ve diğ. (2001)' de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kolonilerden 3 agar plug kesilerek 2 mL'lik viallere alınmış ve 0,6 mL metanol ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt 0,45 µm gözenek çapına sahip filtrelerden süzölmüştür. Ekstrakt yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle OTA varlığı açısından analizlenmiştir.

3.2.4.2 Okratoksin A analizi için HPLC koşulları

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

3.2.4.3 OTA standartlarının hazırlanması

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

çözeltileri kullanılmıştır (Çizelge 3.7). Kalibrasyon çözeltileri çalışma standardından gerekli miktarın balonjojede enjeksiyon çözgeninde seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7 : Okratoksin A kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması.

Kalibrasyon çözeltisinin konsantrasyonu (ng/mL)	Çalışma standardından alınan miktar (µL)	Enjeksiyon çözgeni miktarı (µL)
2,0	40	4960
5,0	100	4900
10,0	200	4800
20,0	400	4600
30,0	600	4400

3.2.4.4 Geri kazanım oranının belirlenmesi

OTA analizi için geri kazanım oranının belirlenmesi için OTA düzeyi 2,9 µg/mL ve 3,4 µg/mL olacak şekilde besiyerine OTA ilave edilmiştir. Toksin ekstraksiyonu 3.2.3.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım oranları 2,9 µg/mL için % 80 ve 3,4 µg/mL için % 70 olarak belirlenmiştir.

3.3 Hesaplamalar ve İstatistiksel Analiz

Küf gelişmesine esansiyal yağ ve bunların konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi amacıyla Baranyi modeli kullanılmıştır. Baranyi modelinde Microsoft Excel DMFit eklentisi kullanılarak Baranyi ve Roberts (1994)' e göre maksimum gelişme hızı hesaplanmıştır. Baranyi modelinde kullanılan denklemler 3.2 ve 3.3'deki gibidir (Garcia ve diğ., 2009).

$$y = y_0 + \mu_{max}A - \ln \left\{ 1 + \frac{[\exp(\mu_{max}A) - 1]}{\exp(y_{max} - y_0)} \right\} \quad (3.2)$$

$$A = t + \left(\frac{1}{\mu_{max}}\right) \ln[\exp(-\mu_{max}t) + \exp(-\mu_{max}\lambda) - \exp(-\mu_{max}t - \mu_{max}\lambda)] \quad (3.3)$$

Küf gelişmesi ve okratoksin A oluşumuna esansiyel yağ ve bunların konsantrasyonunun etkisi $\alpha=0,05$ önem düzeyinde tek yollu ANOVA ile araştırılmıştır. Ayrıca okratoksin A oluşumuna inkübasyon süresinin etkisi $\alpha=0,05$

önem düzeyinde tek yollu ANOVA ile incelenmiştir. Ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır. İstatistiklerin oluşturulmasında SPSS (IBM SPSS STATICS 20) programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Farklı Esansiyel Yağların *Aspergillus carbonarius*'un Gelişimine Etkisi

Yapılan çalışmada *A. carbonarius* 3904-X4 izolatının gelişmesine 8 farklı esansiyel yağın (dereotu, fesleğen, kakule, kekik, kimyon, mercanköşk, rezene, zencefil) ve bunların farklı miktarlarının (2,5; 5; 10; 20; 40 µL) etkisi disk difüzyon yöntemiyle incelenmiştir. *A. carbonarius* 3904-X4 izolatı Elikoğlu (2013) tarafından yapılan çalışmada en hızlı gelişmeyi (19,58 mm/gün) gösteren izolat olmasından dolayı seçilmiştir.

İncelenen *A. carbonarius* 3904-X4 izolatının gelişimine esansiyel yağların etkisi Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. 20 µL esansiyel yağ kullanılmasıyla rezene (70 mm) ve zencefil (10 mm) hariç kullanılan tüm esansiyel yağlar 3904-X4 izolatının gelişmesini tamamen (90 mm) engellemiştir. Zencefil esansiyel yağı diğer yağlara göre 3904-X4 izolatına karşı en düşük inhibisyonu göstermiştir. 40 µL zencefil esansiyel yağı varlığında *A. carbonarius*'un inhibisyon zonu 13 mm bulunmuştur.

Bununla birlikte yapılan bir çalışmada zencefil esansiyel yağı 6 µL yağ ilavesinde *F. Moniliforme* gelişimini tamamen engellemiştir (Singh ve diğ., 2008). Yamamoto-Ribeiro ve diğ. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada potato dextrose agar (PDA) besiyerinde *F. Moniliforme* küfüne karşı zencefil esansiyel yağının etkisi incelenmiştir. Zencefil esansiyel yağı *F. Moniliforme* gelişimini 2500 µg/mL konsantrasyonda engellemiştir. Bu durum esansiyel yağların hidrofobik yapıda olmaları ve hücre zarına hasar vermeleri ile açıklandığı ifade edilmiştir (Dambolena ve diğ., 2008; Dambolena ve diğ., 2010).

Antifungal etkinin daha iyi belirlenebilmesi için yüksek etki gösteren yağlara (dereotu, fesleğen, kimyon, kekik, kakule, mercanköşk, rezene) seyreltme işlemi yapılmıştır. Seyreltme sonucunda kontrole göre dereotu, fesleğen ve rezene esansiyel yağlarında sporlanma daha az olmasına rağmen önemli bir inhibisyon etkisi

görülmemiştir. Kimyon esansiyel yağının 1:5 seyreltmede inhibisyon zonu oluşturmada da sporlanmayı engellediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 : *Aspergillus carbonarius* 3904-X4 izolatının gelişimine esansiyel yağların etkisi.

Yağ adı	İnhibisyon zonu (mm)							
Miktar (µL)	2,5	5				10	20	40
Seyrelme	-	-	1:5	1:10	1:20	-	-	-
Dereotu	6	45	EY ¹	EY	EY	- ²	90	-
Fesleğen	6	-	EY	EY	EY	45	90	-
Kakule	7	-	-	-	-	12	90	-
Kekik	90	-	27	16	8	-	90	-
Kimyon	53	-	EY	EY	EY	-	90	-
Mercanköşk	90	-	45	25	11	-	90	-
Rezene	8	26	EY	EY	EY	-	70	-
Zencefil	-	-	-	-	-	-	10	13

¹EY: Etki yok.

² -: Analiz yapılmamıştır.

Kimyon esansiyel yağının antifungal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *Penicillium commune* ve *Fusarium solani* gelişiminin engellenmesi için 40 µL kimyon esansiyel yağının kullanılması ile herhangi bir inhibisyonun olmadığı belirlenmiştir (Thyagaraja ve Hosono, 1996). Bu çalışmada ise 2,5 µL ve 20 µL kimyon esansiyel yağı ilavesinde *A. carbonarius*'a karşı antifungal etki belirlenmiştir. Rezene (*Foeniculum vulgare* L.) ekstraktından 20µg (kağıt diskte) ilave edildiğinde *Aspergillus flavus*'a karşı antimikrobiyal aktivite çapını 18-22 mm olarak belirlemişlerdir (Roby ve diğ., 2013).

Çalışmada en yüksek inhibisyon zonlarını kekik ve mercanköşk esansiyel yağları göstermiştir. 2,5 µL kekik ve mercanköşk esansiyel yağı kullanımda *A. carbonarius* tamamen inhibe olmuştur. Kekik ve mercanköşk esansiyel yağları bu seyreltme oranlarında diğer yağlara göre gelişimi belli miktarlarda engellemişlerdir. Mercanköşk esansiyel yağı 1:5 seyreltmede 45 mm, 1:10 seyreltmede 25 mm, 1:20 seyreltmede 11 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Bazı esansiyel yağların *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* ve *Fusarium moniliforme*'ye inhibitör etkisinin test edildiği bir çalışmada kekik (500 ppm),

fesleğen (300 ppm) esansiyel yağlarının bu küflere karşı tamamen etkili olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada da fesleğen esansiyel yağı *A. carbonarius*'a karşı antifungal etki göstermiştir. Ayrıca literatürde kekik esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarda tahıllarda mikotoksin üretimini etkilediğini ifade etmişlerdir (Soliman ve Badeaa, 2002).

Cetin ve diğ. (2011) tarafından mercanköşk (*Origanum acutidens* ve *Origanum rotundifolium*) ve kekik (*Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*) esansiyel yağlarının bazı küflere etkisi disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Maksimum inhibisyon zonu küfe bağlı olarak 8-74 mm arasında bulunmuştur.

Czapek's dox agar besiyerinde disk difüzyon metodu ile *A. fumigatus* ve *A. niger* küflerine kakule (*Elettaria cardamomum*) ve zencefil (*Zingiber officinale*) ve bazı esansiyel yağlarının etkisi incelenmiştir. Kakule esansiyel yağının antimikrobiyal aktivitesi 5 mm çaplı kağıt disklere 100 µg, 50 µg, 25 µg ve 12,5 µg miktarlarında konulduğunda sırayla *A. fumigatus*'a karşı 13±0,5 mm, 12±0,5 mm, 10,5±0,5mm, 10±0,5 mm ve *A. niger*'a karşı 12±0,5 mm, 11±0,5 mm, 10±0,5 mm, 9±0,5 mm inhibisyon zonu oluşturmuşlardır. Aynı konsantrasyonlarda zencefil esansiyel yağı *A. fumigatus*'a karşı 15±0,5 mm, 13±0,5 mm, 12±1,1 mm, 10±0,0 mm ve *A. niger*'a karşı 14±0,5 mm, 12±0,5 mm, 10±1 mm, 8±0,0 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur (Bansod ve Rai, 2008).

4.2 *Aspergillus carbonarius* İzolatlarının Gelişimine Kekik ve Kakule Esansiyel Yağlarının Etkisi

Aspergillus carbonarius'un gelişime hızını ve okratoksin A oluşturma özelliklerini belirlemek amacıyla ön denemelerde yüksek ve düşük antifungal aktivite gösteren kekik ve kakule esansiyel yağları seçilmiştir.

Kekik ve kakule esansiyel yağlarının *Aspergillus carbonarius* izolatlarının gelişimi üzerine inhibitör etkisi denklem 3.1 ile hesaplanmıştır.

Yapılan çalışmada 5. günden sonra kontrol petrisi tamamen dolmuştur. Bu nedenle % inhibisyon oranlarının hesaplanması 4. gün için yapılmıştır. *Aspergillus carbonarius* izolatlarının gelişimine kekik ve kakule esansiyel yağlarının inhibitör etkisi ((%) I) Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de, ilgili grafikler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Çalışmada 35-03X1 ve 57-03D1 izolatları 0,09 µg/mL kekik esansiyel yağı varlığında tamamen inaktive olurken, 3904-X4 izolatının aynı konsantrasyonda % 96'sı inaktive olmuştur. 3904-X4 izolatının tamamen inaktivasyonu için 0,12 µg/mL kekik esansiyel yağı kullanımında gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.2 : *Aspergillus carbonarius* izolatlarının gelişiminin % inhibisyonu üzerine kekik esansiyel yağının etkisi.

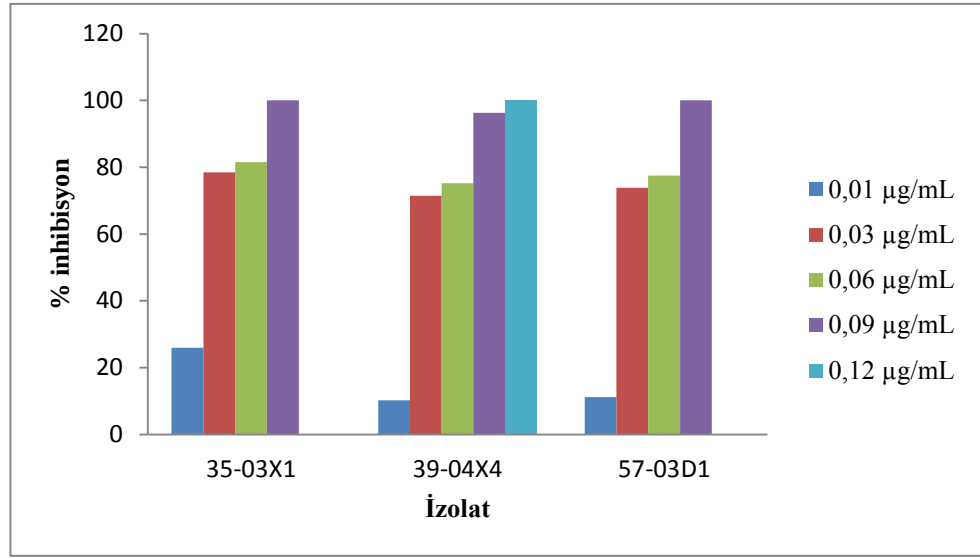
Örnek adı	% inhibisyon					
Miktar (µg/mL)	0,01	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15
35-03X1	26	78	82	100	100	100
39-04X4	10	71	75	96	100	100
57-03D1	11	74	78	100	100	100

Kocić-Tanackov ve diğ. (2012) *Aspergillus spp.* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, ve *Aspergillus wentii*)'nin gelişimi üzerine mercanköşk ekstraktının inhibitor etkisini araştırmışlardır. Mercanköşk ekstraktının temel bileşenlerinin karvakrol (34.20%) ve karvone (18.05%) olduğu belirlenmiştir. Çalışmada mercanköşk ekstraktının 2,5 ml/100 mL konsantrasyonda kullanılmasıyla *Aspergillus wentii* tamamen inhibe olmuştur. Bu konsantrasyonda *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*'un inhibisyonu sırayla % 45,6 ve % 95,6 bulunmuştur.

Gerçekleştirilen çalışmada kekik esansiyel yağının antifungal etkisi konsantrasyona bağlı olarak % 10 ile % 100 arasındadır. Kekik (*Tymus vulgaris L.*) esansiyel yağının *Penicillium digitatum*, *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum gloeosporioide* küflerinin misel büyümesinin incelendiği diğer bir çalışmada PDA besiyerinde 30 gün inkübasyon yapılmıştır. Kekik esansiyel yağının bu küflere karşı fungustatik etki yaptığı ve %50, 75, 100 konsantrasyonlarda yağın misel gelişimini tamamen inhibe ettiği belirtilmiştir (Katooli, 2012).

Nguefack ve diğ. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada kekik (*Thymus vulgaris*) esansiyel yağının *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus fumigatus* küflerine etkisi incelenmiştir. 300 ppm kekik esansiyel yağı *A. flavus*'un gelişimini 81%, 200 ppm kekik esansiyel yağı *Aspergillus fumigatus*'un gelişimini %70 azaltmıştır. 1000 ppm kekik esansiyel yağı kullanımıyla *A. flavus*'un gelişimi tamamen durmuştur.

Çalışmada kekik esansiyel yağına göre kakule esansiyel yağı için daha yüksek konsantrasyonlarda antifungal etki belirlenmiştir. *Aspergillus carbonarius* 35-03X1 ve 57-03D1 izolatları 0,6 µg/mL kakule esansiyel yağı varlığında 4. günde tamamen inhibe olurken, 3904-X4 izolatı 0,9 µg/mL kakule esansiyel yağı varlığında tamamen inhibe olmuştur. 3904-X4 izolatı kakule esansiyel yağı için de diğer izolatlara göre daha dirençli bulunmuştur. Ancak kakule esansiyel yağı varlığında etkinin fungistatik olduğu belirlenmiştir. Çalışmada % inhibisyon oranlarının hesaplandığı 4. günden sonra bazı konsantrasyonlarda gelişme gözlenmiştir.

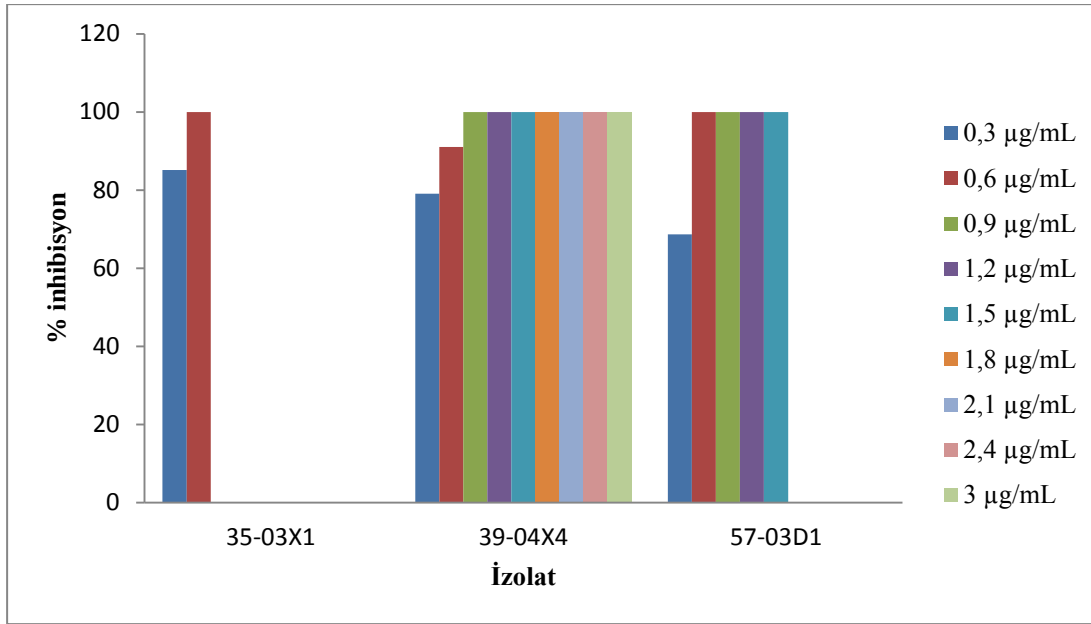


Şekil 4.1: *Aspergillus carbonarius* izolatlarının gelişiminin inhibisyonu üzerine kekik esansiyel yağının etkisi.

Kakule esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* izolatlarına karşı inhibisyon etkisi kekik esansiyel yağına karşı daha azdır. *Aspergillus carbonarius* 3904-X4 izolatı için 0,09 µg/mL kekik esansiyel yağı %71 inhibisyon sağlarken, daha yüksek konsantrasyondaki kakule esansiyel yağı (0,3 µg/mL) % 79 inhibisyon sağlamıştır.

Çizelge 4.3 : *Aspergillus carbonarius* izolatlarının gelişiminin % inhibisyonu üzerine kakule esansiyel yağının etkisi.

Örnek adı	% inhibisyon								
Miktar (µg/mL)	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	3,0
35-03X1	85	100	100	100	100	100	100	100	100
39-04X4	79	91	100	100	100	100	100	100	100
57-03D1	69	100	100	100	100	100	100	100	100



Şekil 4.2: *Aspergillus carbonarius* izolatlarının gelişiminin inhibisyonu üzerine kakule esansiyel yağının etkisi.

MİK, mikroorganizmanın engellendiği en düşük konsantrasyon olarak ve MFK, fungal gelişimin tamamen engellendiği en düşük konsantrasyonu ifade etmektedir.

Elikoğlu (2013) tarafından yapılan çalışmada deneysel gelişme hızı (g, mm/gün) ve süreler değerlendirildiğinde *A. carbonarius* izolatları için 0,97 su aktivitesi değerinde ve 30°C’de optimum gelişme hızı sağlanmıştır. Yapılan çalışmada bu a_w ve sıcaklıkta MİK tayini için 14 gün ve MFK tayini için ise 14 gün inkübasyon sonunda gelişme olmayanlar 5 gün daha inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 4.4’de kekik ve kakule esansiyel yağlarının *Aspergillus carbonarius* izolatları için MİK ve MFK değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.4 : Kekik ve kakule esansiyel yağlarının *Aspergillus carbonarius* izolatları için MİK ve MFK değerleri.

Küf izolatı	MİK (µg/mL)		MFK (µg/mL)	
	Kekik EO	Kakule EO	Kekik EO	Kakule EO
35-03X1	0,09	0,6	0,09	0,6
39-04X4	0,12	3,0	0,12	3,0
57-03D1	0,09	1,5	0,09	1,5

Bu alışmada 35-03X1 ve 57-03D1 izolatları için kekik esansiyel yağı 0,09 µg/mL, kakule esansiyel yağı sırayla 0,6 ve 1,5 µg/mL MİK değerleri belirlenmiştir. 3904-X4 izolatına karşı kakule esansiyel yağının etkili olması için gereken en dūřuk konsantrasyon 3 µg/mL olarak bulunmuştur.

Ownagh ve dię. (2012) tarafından yapılan çalıřmada *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* ve *Fusarium solani* kūflerine kekik, agastache, satureja esansiyel yaęlarının etkisi incelenmiřtir. Būtin esansiyel yaęların çalıřılan kūflere karřı etkili olduęu ancak en etkili yaęın 62,5 µl/mL konsantrasyonda kekik olduęu ortaya konmuřtur. 250 µl/mL konsantrasyonda fungal geliřmeyi engelledięi belirtilmiřtir. Bu çalıřmada da kekik yaęı çalıřılan dięer yaęlara daha yūksek antifungal etki gōstermiřtir.

Sokolic-Mihalak ve dię. (2012) kekik (*Thymus serpyllum* L.) esansiyel yaęı ve kekięin bir bileřeni olan timolūn antifungal özellięini *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* ve *A. niger* kūflerine karřı etkisini PDA besiyerinde gōzlemlemiřlerdir. *Aspergillus ochraceus*un kekik ve timole *A. carbonarius* ve *A. niger*'e gōre daha duyarlı olduęu belirlenmiřtir. *A. carbonarius*'a karřı MİK deęerleri kekik esansiyel yaęı için 1,25 µl/mL ve timol için 0,125 µl/mL'dir.

Kakule esansiyel yağının bazı bakteri ve kūflere karşı antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise MİK değerinin 0,5-0,9 mg/mL olduğu belirlenmiştir (Badei ve dię., 1991). Yapılan çalışmada kakule esansiyel yağının *A. carbonarius*'un inhibisyonu için daha dūřuk MİK değerleri (0,6-3 µg/mL) belirlenmiştir.

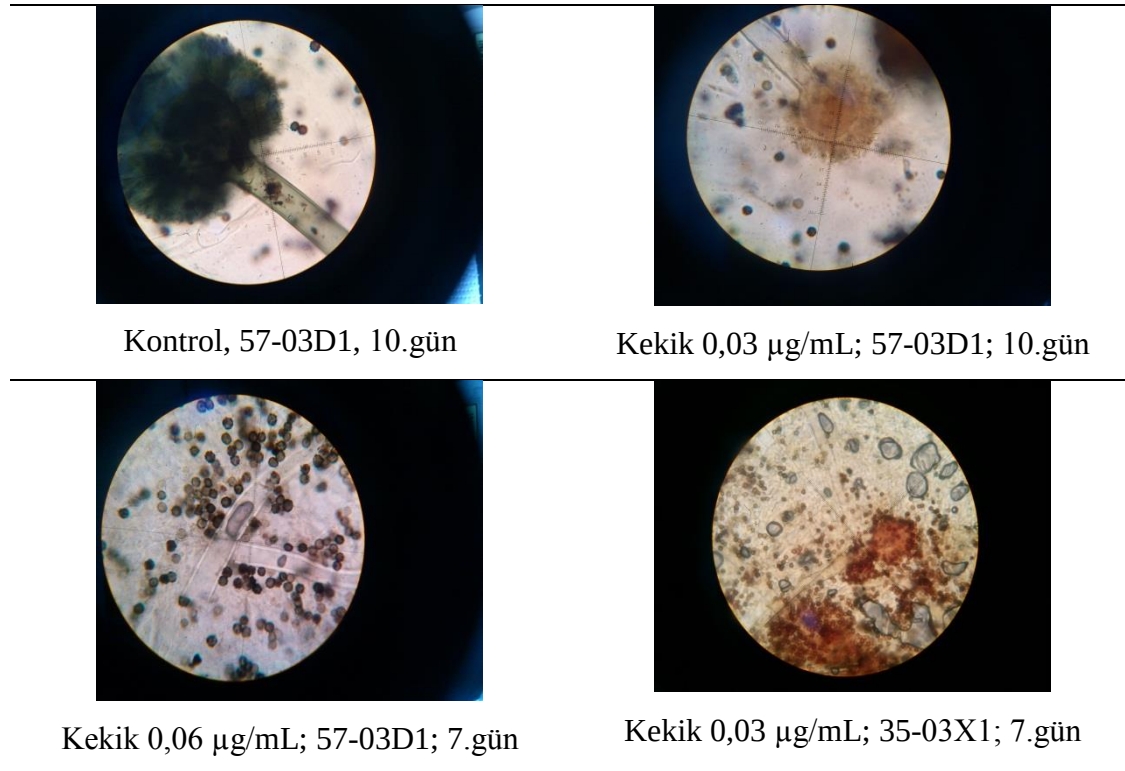
Çalıřmalarda yaęların etkisi konsantrasyona ve çalıřılan kūf tūrūne baęlı olarak farklılık gōstermektedir. Dięer bir çalıřmada da kakule esansiyel yaęının *Penicillium spp.* ve *Aspergillus oryzae*'nin inhibisyonu için MİK deęerini % 4 den daha az olarak belirlemiřlerdir (Hirasa ve Takemasa, 1998).

Elgayyar ve dię. (2001) yaptıkları çalışmada disk difūzyon metoduna PDA besiyerinde kakulenin bazı kūflere karşı inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Kakule esansiyel yağına karşı *Aspergillus niger* 18 mm, *Geotrichum candidum* 20 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur.

A. fumigatus ve *A. niger* küflerine karşı kakule (*Elettaria cardamomum*) esansiyel yağına agar dilüsyon metodu ile MİK (% v/v) tayini yapılmıştır. MİK değeri % 2'den fazla bulunmuştur. Kakule esansiyel yağı kontrole göre *A. fumigatus* ve *A. niger*'e daha düşük aktivite göstermiştir. Bu sonuçlara göre esansiyel yağların farmasötik ve koruyucu etki sağladığı görülebilir (Bansod ve Rai, 2008).

Bu çalışmada minimum fungisidal konsatrasyon (MFK) ve MİK değerleri eşit olarak belirlenmiştir. Literatürde de MİK ve MFK değerlerini eşit belirleyen çalışmalar mevcuttur. *Candida albicans*'a karşı kekik esansiyel yağının etkisi incelendiği çalışmada MİK ve MFK değerleri (16 µl/mL) aynıdır. Bununla birlikte lavanta esansiyel yağı için *Candida albicans*'a karşı MİK değeri 8 µl/mL, MFK değeri 16 µl/mL olarak bulunmuştur (Thosar ve diğ., 2013).

Çalışmada yüksek antifungal etki gösteren kekik esansiyel yağının *A. carbonarius*'un mikroskobik yapısına etkisi de incelenmiştir. Şekil 4.3'de kekik esansiyel yağının bazı *Aspergillus carbonarius* izolatlarına etkisinin mikroskopta incelenmesi ile elde edilen görüntüler verilmiştir.



Şekil 4.3: *Aspergillus carbonarius* izolatlarına karşı kekik esansiyel yağı etkisinin mikroskopta incelenmesi.

57-03D1 izolatına ait kontrol örneği 10. günde incelendiğinde konidyaların 8-9 µm çapında, küre şeklinde ve oldukça pürüzlü olduğu görülmektedir. Bu izolata 0,03 µg/mL konsantrasyonda kekik esansiyel yağı uygulandığında kontrole göre konidyafor (condiophore) boyu kısalmış ve 0,5 mm olarak ölçülmüştür.

0,06 µg/mL konsantrasyonda kekik esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* 57-03D1 izolatına etkisi 7.günde incelendiğinde konidya şekillerinin küre yerine elipsoidal hal aldığı ve pürüzlülüğün azaldığı belirlenmiştir. *Aspergillus carbonarius* 35-03X1 izolatına karşı 0,03 µg/mL konsantrasyonda kekik esansiyel yağının etkisi 7.günde incelendiğinde konidya çapı 6-7 µm olarak ölçülmüş ve konidya pürüzlülüğünün 57-03D1 izolatına göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Literatürde de MİK değerinin altındaki konsantrasyonlarda hücre yapısında değişiklikler olduğu belirtilmiştir. Mitchell ve diğ. (2010) *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* ve *A. ochraceus* un mercanköşk (*Origanum vulgare* L.) esansiyel yağına karşı önemli derece de hassasiyet gösterdiklerini bulmuştur. *A. flavus* 1,25 µL/mL ve *A. parasiticus* 2,5 µL/mL konsantrasyonlarda tamamen inhibe olmuşlardır. MİK değeri tüm küfler için 0,6 µL/mL ve mfk değeri 1.25-2,5 µL/mL arasında bulunmuştur. Elektron mikroskobu altında *A. parasiticus* morfolojik olarak incelendiğinde sitoplazmada sızıntı, pigment kaybı, hücre yapısında bozukluk belirlenmiştir.

Diğer bir çalışmada da kekik esansiyel yağının *Geotrichum citri-aurantii*'ye karşı antifungal aktivitesi mikroskop altında Liu ve diğ. (2009) tarafından incelenmiştir. Kekik esansiyel yağının etkisi önemli düzeyde hiplerde ve konsantrasyon arttıkça sporların duvar kalınlığının artması şeklinde belirtilmiştir.

4.3 *A. carbonarius* İzolatlarının Kekik ve Kakule Esansiyel Yağları Varlığında Gelişmesinin Baranyi Modeli İle İncelenmesi

Yapılan çalışmada üç adet *A. carbonarius* izolatlarının gelişmesine 2 farklı esansiyel yağ (kekik, kakule) ve 15 farklı konsantrasyonun (0,01; 0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; 2,4; 3) etkisi incelenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/mL}$) kekik esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* izolatlarının (35-03X1,39-04X4, 57-03D1) gelişiminde koloni çapının 14 gün boyunca değişim grafikleri Şekil 4.4 de verilmiştir.

Kontrollerin gelişmesi her 3 izolatta da hızlıdır. Kontrol petrilere göre izolatlar karşılaştırıldığında 0,01 $\mu\text{g/mL}$ kekik esansiyel yağının kullanımında en hızlı gelişmeyi 3904-X4 izolatının gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolatu sırasıyla 57-03D1 ve 35-03X1 izolatları takip etmiştir.

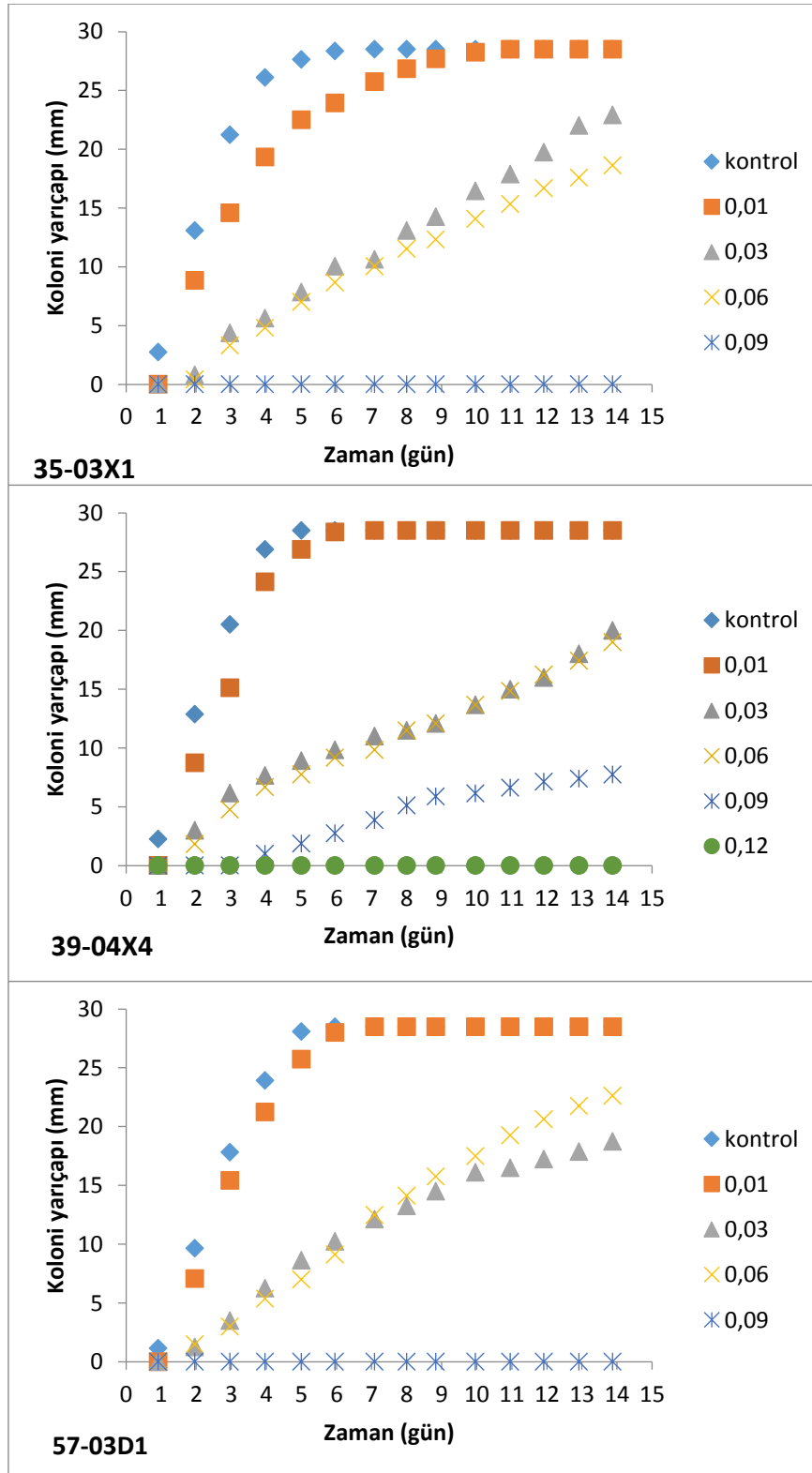
Kekik esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* 35-03X1 izolatına etkisi incelendiğinde konsantrasyon arttıkça gelişme hızının azaldığı görülmüştür. Kontrol petrisi 3. günde 21 mm koloni çapına ulaşırken, 0,03 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kekik yağı ilave edilmiş besiyerinde 35-03X1 izolatu 6 mm koloni çapına ulaşmıştır. 0,06 μg konsantrasyonda gelişim azalmış, 0,09 μg konsantrasyonda gelişme tamamen durmuştur.

Aspergillus carbonarius 3904-X4 izolatının gelişimine kekik esansiyel yağının etkisi incelendiğinde 35-03X1 ve 57-03D1 izolatlarına göre daha hızlı geliştiği görülmektedir. 3904-X4 izolatu 13 mm koloni çapına kontrol petrisinde 2. günde gelirken, 0,03 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kekik esansiyel yağı eklenmiş ortanda 8. günde gelmektedir. 0,01 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kekik esansiyel yağı kullanımıyla 7.günden itibaren petrinin dolduğu görülmektedir.

Kekik esansiyel yağının *A. carbonarius*'a karşı inhibitör etkisinin 28 gün boyunca incelendiği bir çalışmada ilk 16 gün anlamlı bir inhibisyonun olduğu belirlenmiştir (Sokolic-Mihalak ve diğ., 2012).

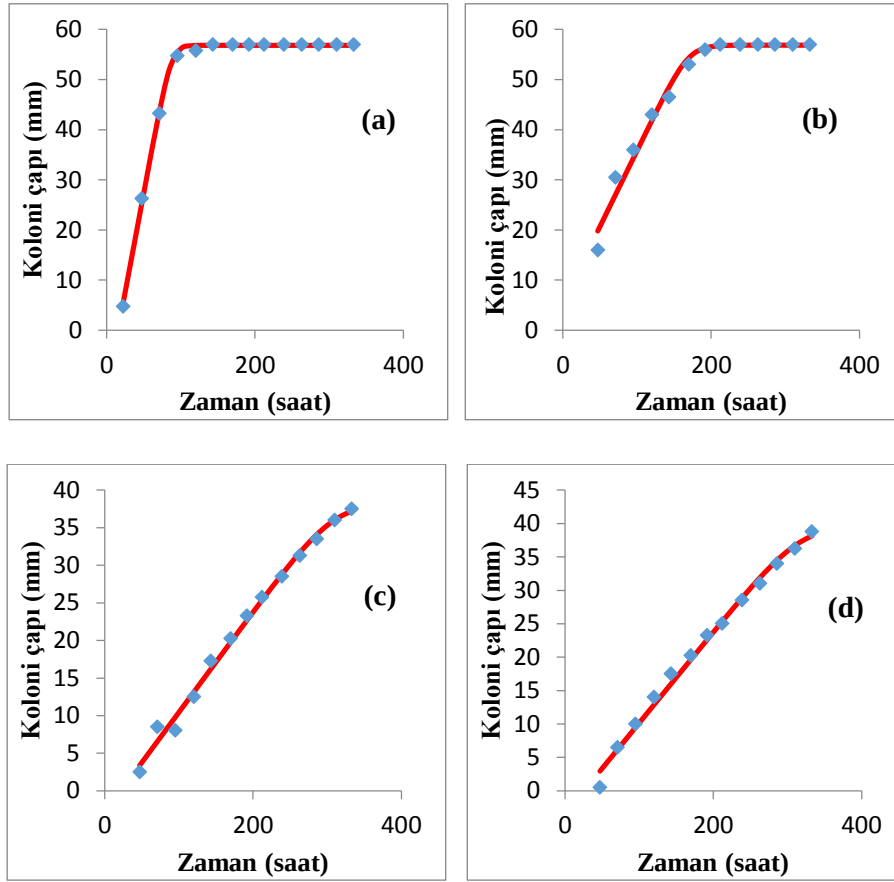
A. carbonarius izolatlarının gelişimine kekik esansiyel yağının etkisinin modellenmesi amacıyla maksimum gelişme hızının hesaplanmasında model olarak Baranyi modeli (Denklemler 3.2 ve 3.3) kullanılmıştır.

Baranyi modelinin uygulanmasında 35-03X1, 3904-X4 ve 57-03D1 izolatlarının kekik esansiyel yağında zamana karşı tahminlenen eğri ve deneysel olarak ölçülen koloni yarıçaplarına ait grafikler sırasıyla Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Grafikler de görüldüğü gibi deneysel ölçümler model ile elde edilen eğri üzerinde yer almaktadır.



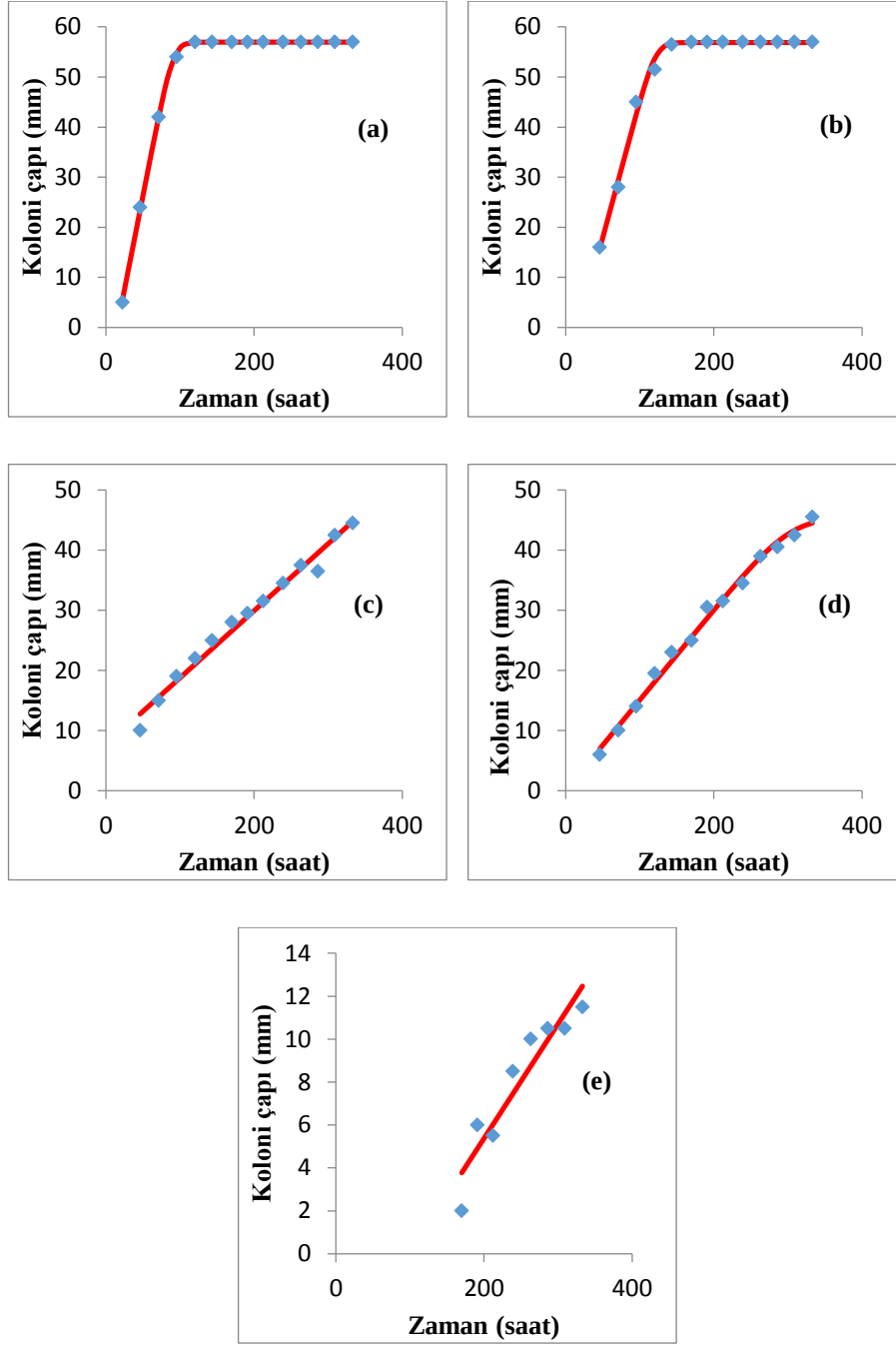
Şekil 4.4: Farklı konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/mL}$) kekik esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* izolatlarının (35-03X1,39-04X4, 57-03D1) gelişiminde koloni çapının zamanla değişimi.

Elde edilen gelişme hızları Çizelge 4.5’de gösterilmiştir. Baranyi modeli ile R^2 değerleri 0,90-1,00 arasında hesaplanmıştır. Çalışmada yüksek korelasyon katsayıları elde edilmesi de modelin uygunluğunu göstermektedir.

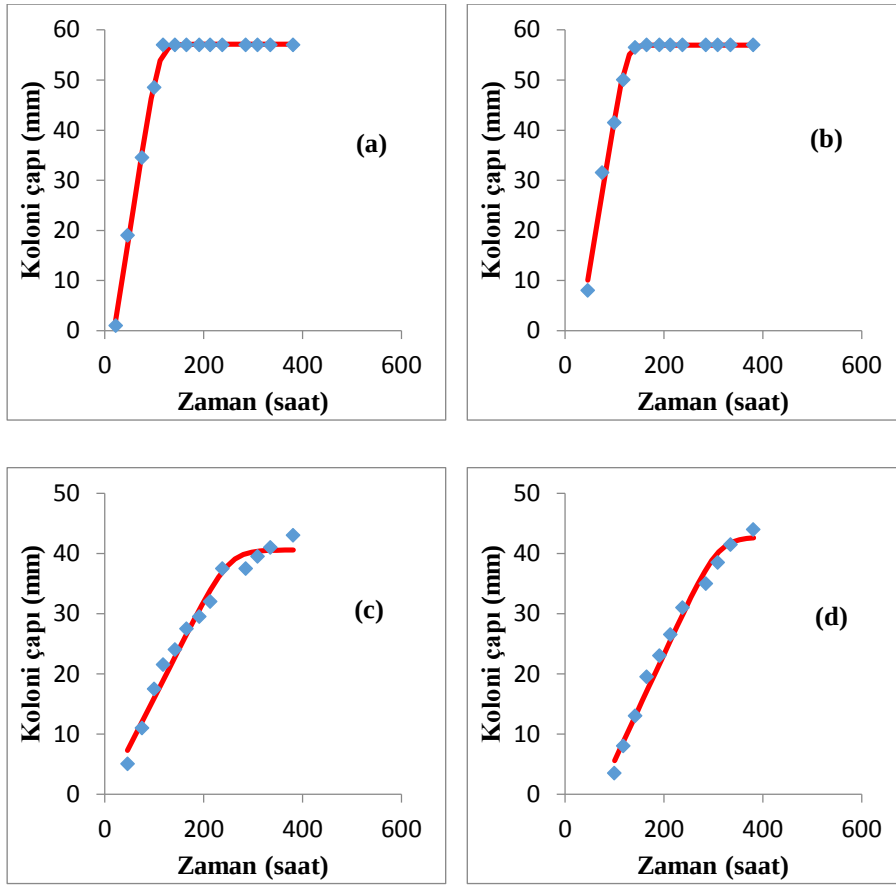


Şekil 4.5: 35-03X1 izolatının Baranyi modelinde ve kekik esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri (a: kontrol, b: 0,01, c: 0,03, d: 0,06), (.: deneysel ölçüm, -: tahminlenen denklemin eğrisi).

Yapılan çalışmada gelişme hızı üzerine 3904-X4 ve 57-03D1 izolatlarına karşı 0.01 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda yağ ilavesinin etkisi kontrolle aynı iken ($p>0,05$), 35-03X1 izolatı için kontrolden farklıdır. 3904-X4 ve 57-03D1 izolatları için yağın etkisi 0,03 ve daha yüksek konsantrasyonlarda kontrolden farklıdır. Konsantrasyon arttıkça gelişme hızı yavaşlamıştır. 0,06 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda gelişme hızları 35-03X1, 3904-X4 ve 57-03D1 izolatları için sırayla 1,70 mm/gün, 1,34 ve 2,14 mm/gün'dür. Kontrole göre gelişme hızları kekik esansiyel yağı kullanımıyla her 3 $\mu\text{g/mL}$ izolat için daha düşük bulunmuştur.



Şekil 4.6: 39-04X4 izolatının Baranyi modelinde ve kekik esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri (a: kontrol, b: 0,01, c: 0,03, d: 0,06, e: 0,09), (.: deneysel ölçüm, -: tahminlenen denklemin eğrisi).



Şekil 4.7: 57-03D1 izolatının Baranyi modelinde ve kekik esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri (a: kontrol, b: 0,01, c: 0,03, d: 0,06), (: deneysel ölçüm, -: tahminlenen denklemin eğrisi).

Çizelge 4.5 : *Aspergillus carbonarius* izolatlarının farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kekik esansiyel yağında Baranyi modeli ile hesaplanan gelişme hızları ve R^2 değerleri.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	35-03X1		39-04X4		57-03D1	
	g (mm/gün)	R^2	g (mm/gün)	R^2	g (mm/gün)	R^2
0	8,20 ^a	0,98	8,87 ^a	1,00	7,38 ^a	0,99
0,01	4,75 ^b	0,99	8,31 ^a	1,00	6,82 ^a	1,00
0,03	1,83 ^b	0,99	1,40 ^b	0,96	2,02 ^b	0,98
0,06	1,70 ^b	0,99	1,34 ^b	0,97	2,14 ^b	0,99
0,09	GG	-	1,03 ^b	0,90	GG	-
0,12	GG	-	GG	-	GG	-

¹GG: Gelişme görülmedi.

^{a,b,c}: Her izolat için aynı kolonda ve aynı konsantrasyonda yer alan değerlerde aynı harf içeren gelişme hızı istatistiksel olarak farklı değildir.

Kekik esansiyel yağının *Aspergillus section Nigri* üyelerinin gelişimine etkisinin incelendiği bir çalışmada da, küf gelişiminin önlenmesi için 0,005 µL/mL kekik esansiyel yağı kullanılmasının istatistiki olarak önemli olmadığı belirtilmiştir. Ancak 0,015 µL/mL kekik esansiyel yağı ilavesinde gelişimin % 42,2-100 arasında azaldığı bildirilmiştir (Passone ve diğ., 2012).

Farklı konsantrasyonlarda (µg/mL) kakule esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* izolatlarının (35-03X1,39-04X4, 57-03D1) gelişiminde koloni çapının zamanla değişim grafikleri Şekil 4.8’de verilmiştir.

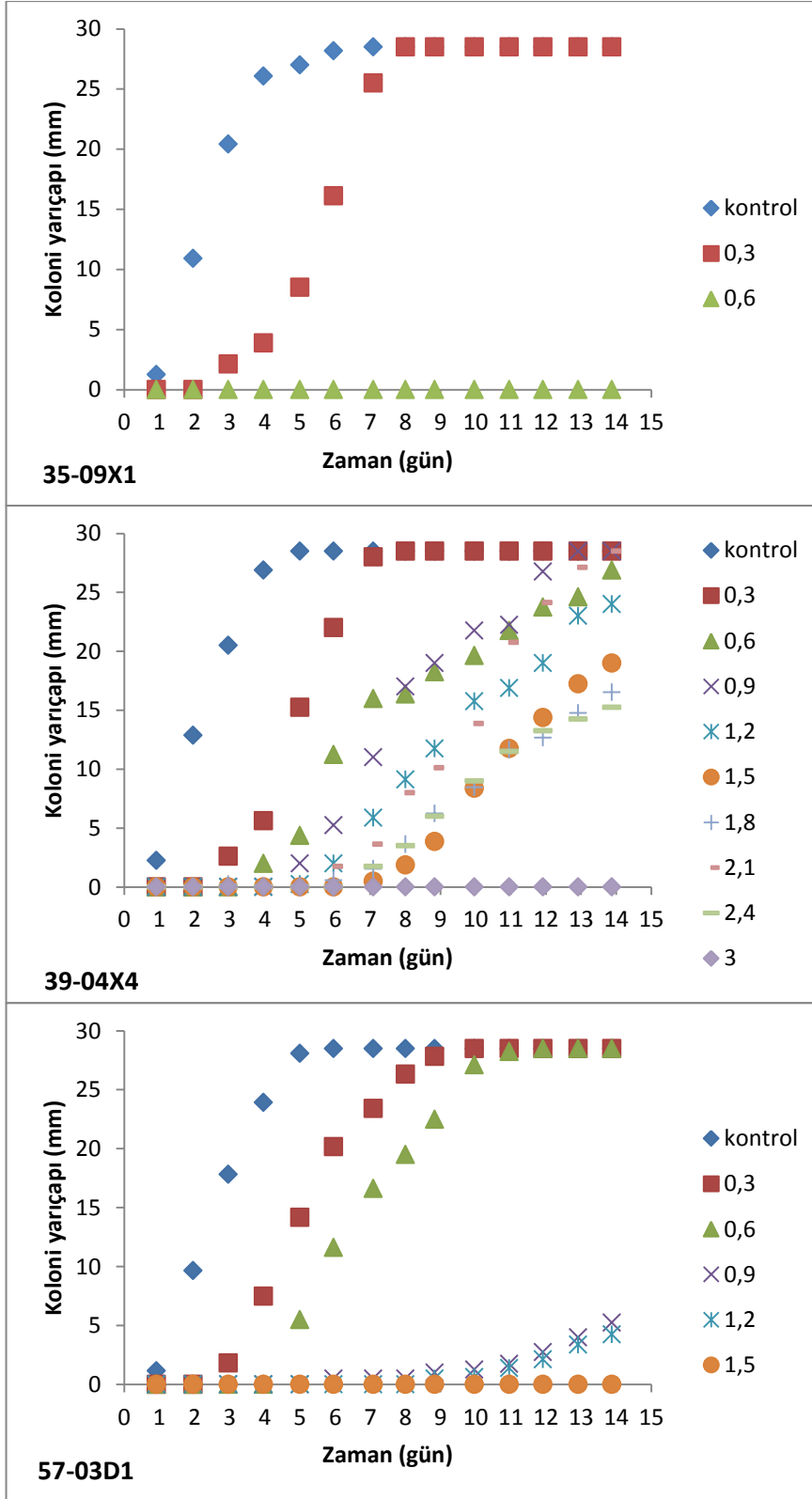
Yapılan çalışmada 35-03X1 izolatının koloni çapı 5.günde kontrol petrisinde 27 mm, 0,3 µg/mL konsantrasyonda kakule esansiyel yağı içeren ortamda 9 mm olarak ölçülmüştür. 8.günden itibaren petriler tamamen dolmuştur.

3904-X4 izolatı 2,4 µg/mL konsantrasyonda kakule esansiyel yağında 7.günden itibaren gelişme başlarken, 3 µg/mL konsantrasyonda gelişme tamamen durmuştur. Kakule esansiyel yağının 3904-X4 izolatının gelişimine etkisi incelendiğinde kekik esansiyel yağının da olduğu gibi 35-03X1 ve 57-03D1 izolatlarına göre daha hızlı geliştiği görülmektedir. 3904-X4 izolatı 13 mm koloni çapına kontrol petrisinde 2. günde gelirken, 1,8 µg/mL konsantrasyonda kakule esansiyel yağı eklenmiş ortamda 12. günde gelmektedir.

Kakule esansiyel yağı 0,3 µg/mL konsantrasyonda en yavaş gelişmeyi 57-03D1 izolatında göstermiştir. 57-03D1 izolatı 0,6 µg/mL konsantrasyonda kakule esansiyel yağı olan ortamda 5.günden itibaren gelişmeye başlarken, 1,2 µg/mL konsantrasyonda kakule esansiyel yağı olan ortamda 9.günden itibaren gelişmeye başlamıştır.

Bazı baharatların *Aspergillus niger*’e karşı antifungal etkisinin PDA besiyerinde araştırılmıştır. Kakule ekstraktının *Aspergillus niger*’e karşı 10 mm inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir (Shukla ve Shukla, 2013).

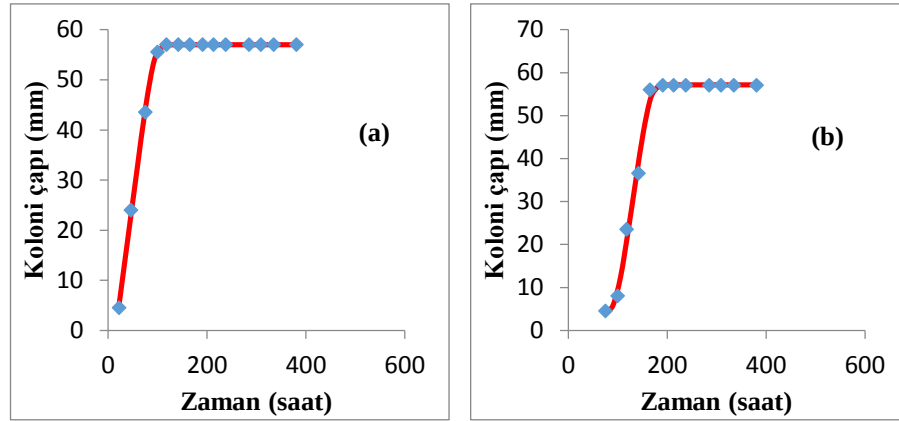
Kakule esansiyel yağı için Baranyi modeli ile elde edilen eğri ve izolatların zamana karşı koloni yarıçaplarındaki değişimler Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Grafikler de görüldüğü gibi deneysel ölçümler model ile elde edilen eğri üzerinde yer almaktadır.



Şekil 4.8: Farklı konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/mL}$) kakule esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* izolatlarının (35-03X1,39-04X4, 57-03D1) gelişiminde koloni çapının zamanla değişimi.

Aspergillus carbonarius izolatlarının farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kakule esansiyel yağında Baranyi modeli ile hesaplanan gelişme hızları ve R^2 değerleri Çizelge 4.6’da verilmiştir. Elde edilen R^2 değerleri 0,98-1,00 arasında değişmektedir. Çalışmada yüksek korelasyon katsayıları elde edilmesi de modelin uygunluğunu göstermektedir.

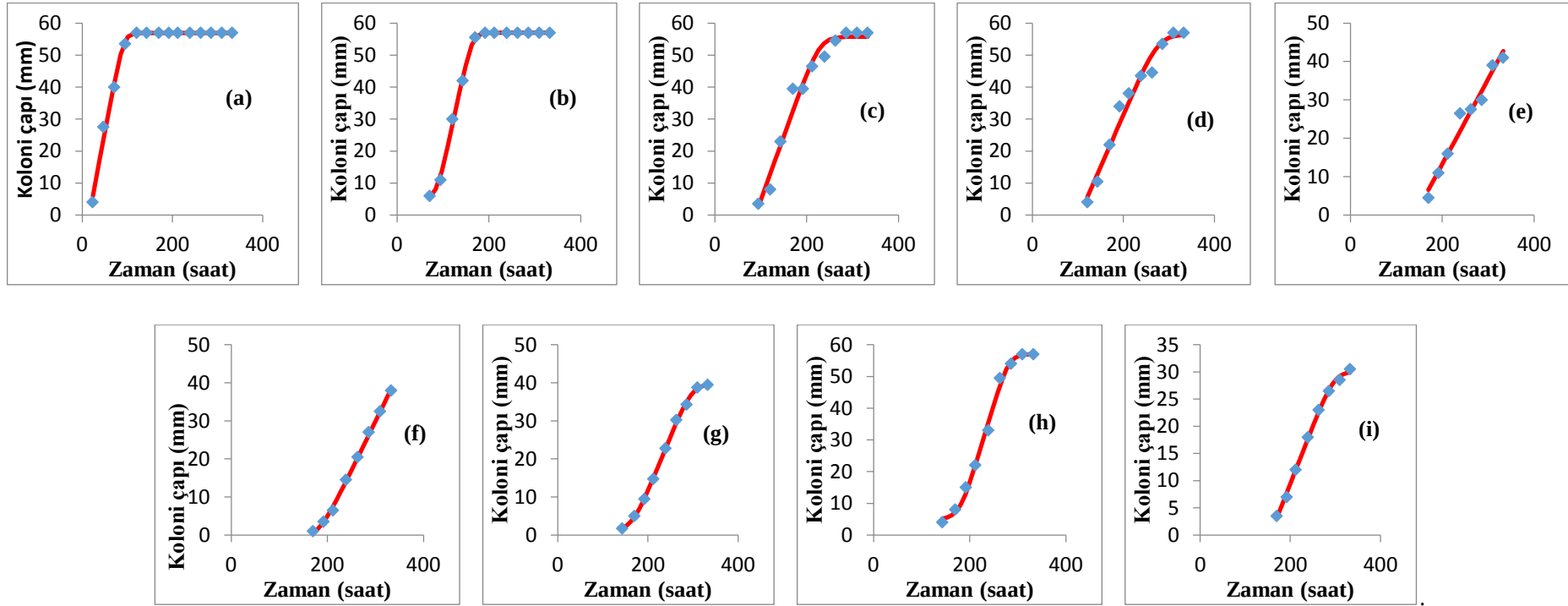
Çizelge 4.6’da verilen gelişme hızlarında günlere göre değişim istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise bazı konsantrasyonlar için önemli bir fark gözlenmezken bazılarında ise istatistiksel olarak farklılık gözlenmektedir ($\alpha=0,05$).



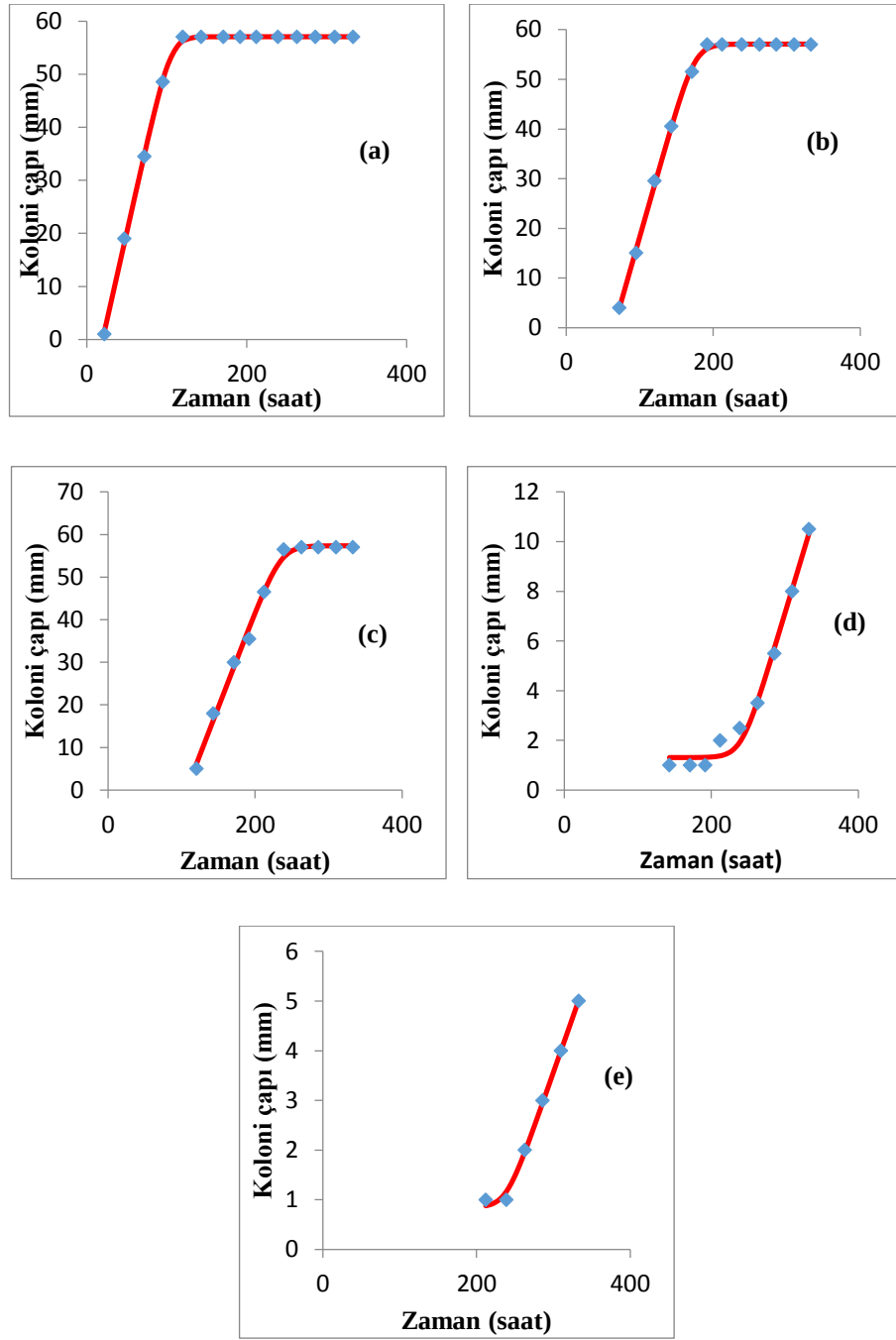
Şekil 4.9 : 35-03X1 izolatının Baranyi modelinde ve kakule esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri (a: kontrol, b: 0,3), (.: deneysel ölçüm, -: tahminlenen denklemin eğrisi).

Çalışmada 35-03X1 izolatının gelişme hızı incelendiğinde kontrol ile 0,3 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kakule esansiyel yağı kullanımı arasında istatistiki olarak bir farkın olmadığı görülmüştür. Benzer sonucun 3904-X4 izolatı için de olduğu hesaplanmıştır.

3904-X4 izolatının gelişme hızının 0,6 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kakule esansiyel yağı kullanıldığında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Kekik esansiyel yağı kullanımında ise 3904-X4 izolatının gelişme hızına etkili önemli konsantrasyonun 0,03 $\mu\text{g/mL}$ olduğu hesaplanmıştır. 0,6 ve 2,4 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında 4,07 ve 2,4 mm/gün olarak hesaplanmış fakat bu farkın önemli 3904-X4 izolatının gelişim hızı için önemli olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.10: 39-04X4 izolatının Baranyi modelinde ve kakule esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri (a: kontrol, b: 0,3, c: 0,6, d: 0,9, e: 1,2, f:1,5, g:1,8, h:2,1, i:2,4), (.: deneysel ölçüm, -: tahminlenen denklemin eğrisi).



Şekil 4.11 : 57-03D1 izolatının Baranyi modelinde ve kakule esansiyel yağından elde edilen zamana karşı koloni yarıçapı grafikleri (a: kontrol, b: 0,3, c: 0,6, d: 0,9, e: 1,2), (.: deneysel ölçüm, -: tahminlenen denklemin eğrisi).

Kakule esansiyel yağının artan konsantrasyonlarda kullanılmasıyla 57-03D1 izolatında gelişme hızı yavaşlamıştır. 57-03D1 izolatının gelişme hızına 0,3 ve 0,6 $\mu\text{g/mL}$ kakule esansiyel yağı kullanılmasıyla 0,9 ve 1,2 $\mu\text{g/mL}$ kakule esansiyel yağı

Çizelge 4.6 : *Aspergillus carbonarius* izolatlarının farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kakule esansiyel yağında Baranyi modeli ile hesaplanan gelişme hızları ve R² değerleri.

Konsantrasyon (µg/mL)	35-03X1		39-04X4		57-03D1	
	g (mm/gün)	R ²	g (mm/gün)	R ²	g (mm/gün)	R ²
0	9,16 ^a	1,00	9,05 ^a	1,00	7,84 ^a	1,00
0,3	9,65 ^a	1,00	8,61 ^a	1,00	5,53 ^b	0,99
0,6	GG ¹	-	4,07 ^{bc}	0,94	4,41 ^b	0,99
0,9	GG	-	3,91 ^{bc}	0,97	1,18 ^c	0,98
1,2	GG	-	2,85 ^c	0,97	1,05 ^c	0,99
1,5	GG	-	3,25 ^{bc}	0,99	GG	-
1,8	GG	-	3,08 ^c	0,99	GG	-
2,1	GG	-	4,84 ^b	0,98	GG	-
2,4	GG	-	2,54 ^c	1,00	GG	-
3	GG	-	GG	-	GG	-

¹GG: Gelişme görülmedi.

^{a,b,c}: Her izolat için aynı kolonda ve aynı konsantrasyonda yer alan değerlerde aynı harf içeren gelişme hızı istatistiksel olarak farklı değildir.

kullanımı arasında önemli farkın olmadığı görülmüştür (p>0,05). Bu şartlarda elde edilen R² değerleri 0,98-1,00 arasında hesaplanmıştır. Yapılan çalışmada en düşük gelişme hızı 1,05 mm/gün ile 57-03D1 izolatına karşı 1,2 µg/mL konsantrasyonda kakule esansiyel yağı kullanımıyla elde edilmektedir.

Baranyi modeliyle hesaplanan gelişim hızları 35-03X1, 3904-X4, 57-03D1 izolatları için 0,3 µg/mL konsantrasyonda kakule esansiyel yağı kullanımda sırasıyla 9,65; 8,61 ve 5,53 mm/gün olarak bulunmuştur. Aynı *A. carbonarius* izolatların kullanıldığı bir çalışmada *A. carbonarius* gelişimi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara benzer olarak gelişme hızının en yüksek olduğu sıcaklık 30°C; su aktivitesi değeri ise 0,97 olarak belirlenmiştir. En hızlı gelişmeyi 19,58 mm/gün gelişme hızı ile 3904X4 izolatı göstermiştir. 35-03X1 izolatının gelişme hızı 17,06 mm/gün; 57-03D1 izolatının gelişme hızı 15,66 mm/gün olarak hesaplanmıştır (Elikoğlu, 2013).

Yapılan diğer bir çalışmada aynı *A. carbonarius* izolatları incir besiyerinde farklı sıcaklık ve su aktivitelerinde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara benzer olarak gelişme hızının en yüksek olduğu sıcaklık 30°C; su aktivitesi değeri ise 0,97 olarak

belirlenmiştir. Baranyi modelinde 35-03X1, 3904X4 ve 57-03D1 izolatlarının maksimum gelişme hızları 30°C’de ve 0,97 su aktivitesinde sırasıyla 24,90; 25,36 ve 26,72 mm/gün değerlerinde tespit edilmiştir. Bu koşullarda elde edilen R^2 değerleri tüm izolatlar için 0,99 olarak hesaplanmıştır (Küçükakar, 2014).

4.4 *Aspergillus carbonarius*’un OTA Üretimine Kekik ve Kakule Esansiyel Yağlarının Etkisi

Çalışmada *A. carbonarius* üyesi 3 izolatın okratoksin A üretimine etkisi farklı konsantrasyonlarda kekik (0,01; 0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15 µg/mL) ve kakule (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; 2,4; 3 µg/mL) esansiyel yağları kullanılarak 7., 10. ve 14. günlerde inkübasyon sonunda incelenmiştir. *Aspergillus carbonarius* izolatlarının OTA üretimine farklı konsantrasyonlarda kekik esansiyel yağının etkisi Çizelge 4.7’de verilmiştir. Kekik esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* izolatlarına ait OTA üretim miktarları Şekil 4.12’de verilmiştir.

Yapılan çalışmada kekik esansiyel yağının 35-03X1 izolatının OTA üretimine etkisi incelendiğinde 0,03 ve 0,06 µg/mL konsantrasyonlarında gelişme olmasına rağmen toksin belirlenmemiştir. 35-03X1 izolatı sadece 0,01 µg/mL kekik esansiyel yağı konsatrasyonda 14. günde 67,94 ng/g toksin üretmiş ve OTA miktarında % 63,15 azalma gerçekleşmiştir. Aynı inkübasyon süresi sonunda kontrol petrisinde 184,38 ng/g OTA üretimi gerçekleşmiştir.

3904-X4 izolatının kekik esansiyel yağı varlığında gelişimin gözlendiği tüm konsantrasyonlarda kullanılmasıyla gelişmesi durmuştur. Bu seviyeye kadar olan konsantrasyonlarda OTA üretimi belirleme limitlerinin altındadır. 57-03D1 izolatı OTA üretimi bakımından kekik esansiyel yağına karşı diğer izolatlardan daha dirençli bulunmuştur. OTA üretimi günlere göre dalgalanmalar göstermiştir. En yüksek miktarda toksin 14. günde 0,01 µg/mL konsatrasyonda gözlenmiştir.

Kekik (*Thymus serpyllum* L.) esansiyel yağı, kekiğin bileşenleri olan timol ve toplam fenollerin *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* ve *A. niger* küflerinin OTA üretimine etkisi 14 ve 21. gün ölçülmüştür.

Çizelge 4.7 : *Aspergillus carbonarius* izolatlarının OTA üretimine farklı konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/mL}$) kekik esansiyel yağının etkisi.

İzolat kodu	İnkübasyon süresi (gün)	OTA miktarı, ng/g					
		Kontrol	0,01	0,03	0,06	0,09	0,12
35-03X1	7	37,70	TB ²	TB	TB	GG ¹	GG
	10	18,08	TB	TB	TB	GG	GG
	14	184,38	67,94	TB	TB	GG	GG
39-04X4	7	40,03	TB	TB	TB	TB	GG
	10	22,61	TB	TB	TB	TB	GG
	14	117,03	TB	TB	TB	TB	GG
57-03D1	7	60,92	TB	TB	TB	GG	GG
	10	183,71	121,81	TB	TB	GG	GG
	14	3635,26	2671,91	6,04	37,07	GG	GG

¹GG: Gelişme görülmedi.

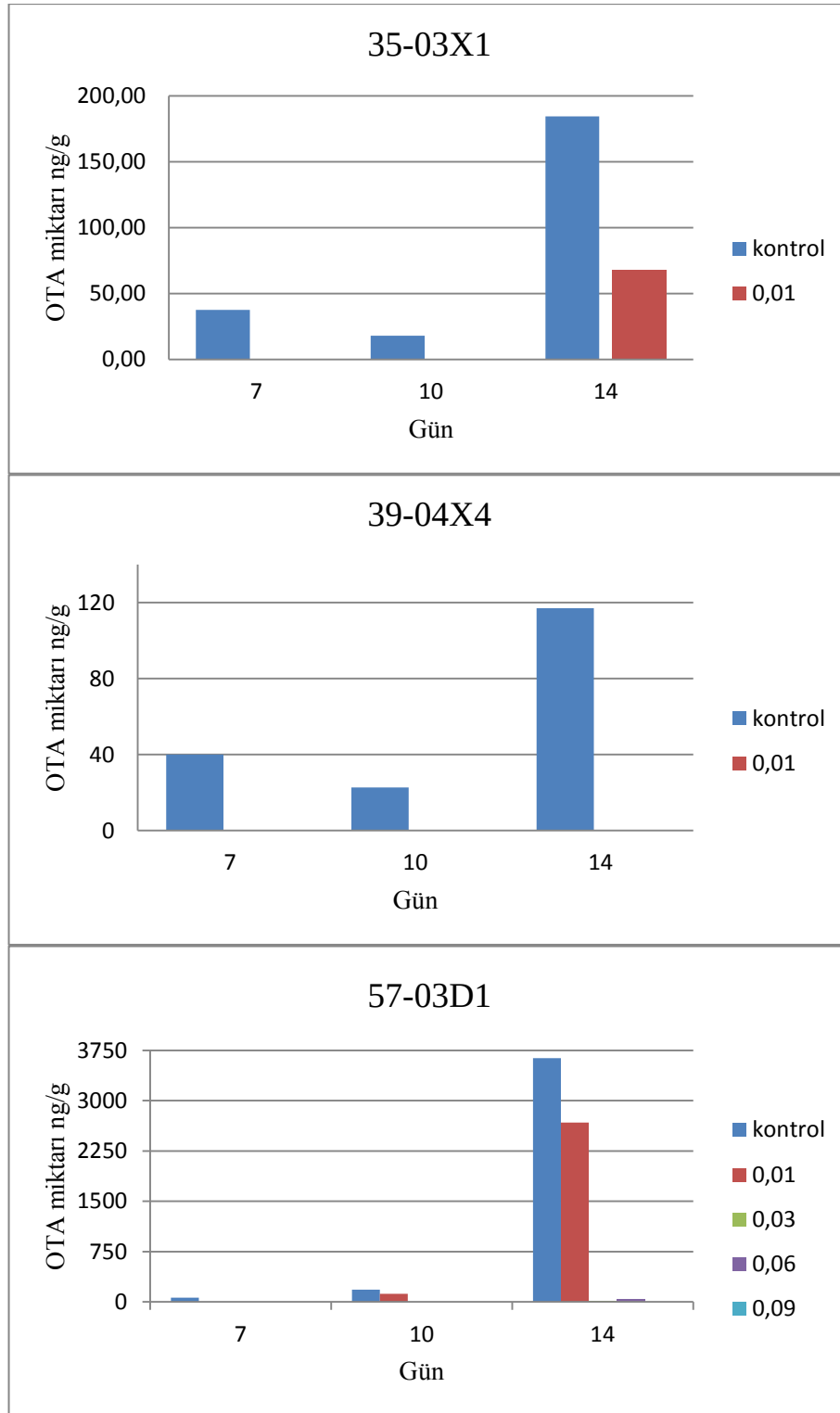
²TB: Toksin belirlenmedi (Belirleme limiti = 0,1 ng/g).

Kekik esansiyel yağının OTA üretimini yaklaşık olarak *Aspergillus ochraceus*'un %75, *A. carbonarius*'un %90 ve *A. niger*'un %68 oranında azalttığını ortaya koymuşlardır. Timol ve toplam fenollerinde benzer sonuçlar verdiği belirtilmiştir (Sokolic-Mihalak ve diğ., 2012). Bu çalışmada da konsantrasyona bağlı olarak *A. carbonarius*'un OTA üretimi kekik esansiyel yağı varlığında %26,5 ile %100 arasındaki oranlarda azalmıştır.

Aspergillus carbonarius izolatlarının OTA üretimine farklı konsantrasyonlarda kakule esansiyel yağının etkisi Çizelge 4.8'de verilmiştir. Bu çizelgeye ait kakule esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* izolatlarına ait OTA üretim miktarları Şekil 4.13'de verilmiştir.

Çalışmada 0,3 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kakule esansiyel yağının 35-03X1 izolatının OTA üretimini 10.günden itibaren engelleyemediği görülmektedir. Bu konsantrasyonda 14. günde kontrolün OTA miktarı 184,38 ng/g 35-03X1 izolatının OTA miktarı 77,73 ng/g bulunmuştur.

Kekik esansiyel yağı 3904-X4 izolatının OTA üretimi çalışılan konsantrasyonlarda tamamen engellerken, 0,6 $\mu\text{g/mL}$ kakule esansiyel yağı OTA üretimi tamamen engellemiştir. 0,3 $\mu\text{g/mL}$ kakule esansiyel yağı kullanıldığında 14.günde 8,5 ng/g OTA hesaplanmıştır.



Şekil 4.12: Kekik esansiyel yağının ($\mu\text{g/mL}$) *Aspergillus carbonarius* izolatlarına ait OTA üretim miktarları.

Çizelge 4.8 : *Aspergillus carbonarius* izolatlarının OTA üretimine farklı konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/mL}$) kakule esansiyel yağının etkisi.

İzolat kodu	İnkübasyon süresi (gün)	OTA miktarı, ng/g						
		Kontrol	0,3	0,6	0,9	1,2	0,15	3,0
35-03X1	7	37,70	TB ²	GG ¹	GG	GG	GG	GG
	10	18,08	TB	GG	GG	GG	GG	GG
	14	184,38	77,73	GG	GG	GG	GG	GG
39-04X4	7	40,03	TB	TB	TB	TB	TB	GG
	10	22,61	TB	TB	TB	TB	TB	GG
	14	117,03	8,50	TB	TB	TB	TB	GG
57-03D1	7	60,92	8,78	TB	TB	TB	GG	GG
	10	183,71	14,85	TB	TB	TB	GG	GG
	14	3635,26	163,44	13,19	30,76	TB	GG	GG

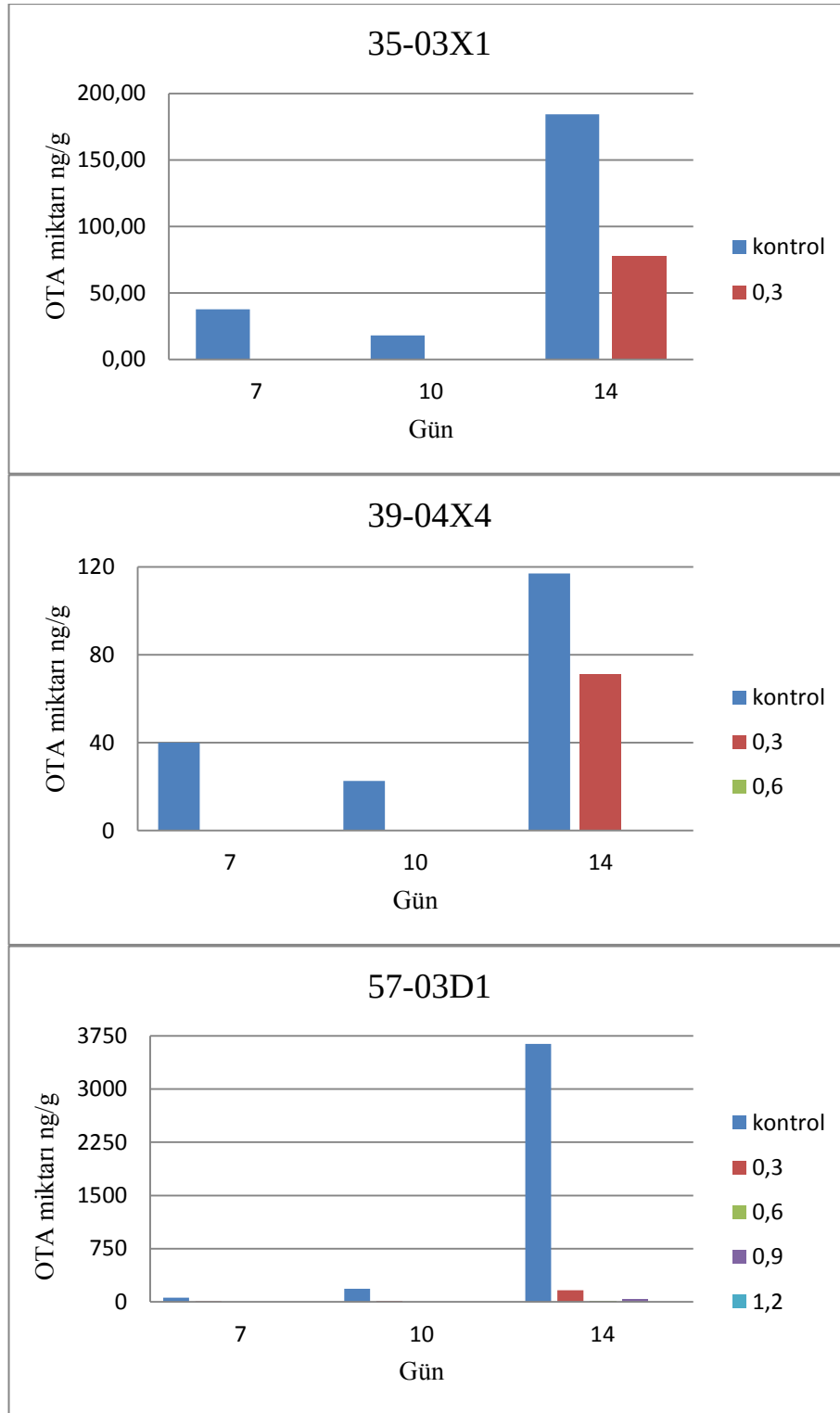
¹GG: Gelişme görülmedi.

²TB: Toksin belirlenmedi (Belirleme limiti = 0,1 ng/g).

57-03D1 izolatının OTA üretimi 0,3 $\mu\text{g/mL}$ kakule esansiyel yağının kullanımıyla zamanla artış gösterdiği belirlenmiştir. 7., 10., 14. günlerde sırayla hesaplanan OTA miktarları bu konsantrasyonda 8,78 ng/g, 14,85 ng/g ve 163,44 ng/g kontrol örneğinde 60,92 ng/g, 183,71 ng/g ve 3635,26 ng/g'dir. *A. carbonarius*'un OTA üretimi konsantrasyona bağlı olarak kakule esansiyel yağı varlığında %57,84 ile %100 arasındaki oranlarda azalmıştır.

Bu çalışmada kullanılan izolatlarla aynı *A. carbonarius* izolatlarının da kullanıldığı bir çalışmada OTA üretimi incir besiyerinde incelenmiştir (Küçükakar, 2014). 7., 10., 14. günlerde OTA üretimi sırayla 35-03X1 izolatı için 105 ng/g, 128 ng/g, 135 ng/g, 3904-X4 izolatı için 183 ng/g, 241 ng/g, 135 ng/g ve 57-03D1 izolatı için 113 ng/g, 149 ng/g, 157 ng/g olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmada *Aspergillus carbonarius* izolatlarının OTA üretim miktarlarının 10. günde yaklaşık olarak kakule esansiyel yağı için 0-36 ng/g, kekik esansiyel yağı için 0-320 ng/g olarak bulunmuştur. *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin gelişimi ve OTA üretimine sıcaklığın etkisinin incelendiği bir çalışmada 30°C'de *Aspergillus carbonarius* izolatlarının 10.günde OTA üretim miktarlarının 120- 950 ng/g arasında olduğu belirlenmiştir (Mutlu-İngok ve Karbancıoğlu-Güler, 2014).



Şekil 4.13: Kakule esansiyel yağının ($\mu\text{g/mL}$) *Aspergillus carbonarius* izolatlarına ait OTA üretim miktarları.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmada Ege Bölgesi'nden toplanan kuru incirlerden izole edilen üç adet *Aspergillus carbonarius* (35-03X1, 39-04X4, 57-03D1) izolatının kekik (0,01; 0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15 µg/mL) ve kakule (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; 2,4; 3 µg/mL) esansiyel yağları ilave edilmiş ortamlarda gelişme ve 7, 10, 14 günlük inkübasyon sürelerinde OTA oluşturma özellikleri 0,97 su aktivitesinde ve 30°C'de araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan kekik ve kakule esansiyel yağları yapılan ön deneme çalışmasında *Aspergillus carbonarius*'a karşı etkileri göz önünde bulundurularak seçilmiştir. İzolatların gelişme hızları Baranyi modeli ile hesaplanmıştır. *A. carbonarius* izolatlarının okratoksin A üretimleri mikotoksin ekstraksiyonu yapıldıktan sonra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir.

Çalışmada kakule esansiyel yağı için kekiğe göre daha yüksek MİK ve MFK değerleri belirlenmiştir. *A. carbonarius* 35-03X1 ve 57-03D1 izolatlarının gelişimi 0,09 µg/mL, 3904-X4 izolatının ise 0,12 µg/mL kekik esansiyel yağı varlığında tamamen engellenmiştir. Kakule esansiyel yağı varlığında 4. günde 35-03X1 ve 57-03D1 izolatları 0,6 µg/mL konsantrasyonda gelişme belirlenmezken, 3904-X4 izolatı 0,9 µg/mL kakule esansiyel yağında konsantrasyonda gelişme göstermemiştir.

Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri kekik esansiyel yağı 0,09 µg/mL konsantrasyonunda 35-03X1 ve 57-03D1 izolatları için, en yüksek MİK değeri 3,0 µg/mL kakule esansiyel yağı 3904-X4 izolatı için bulunmuştur. Minimum fungisidal konsantrasyon (MFK), yapılan çalışmada MİK değerleri ile aynı sonucu vermiştir.

Kontrol petrilere göre izolatlar karşılaştırıldığında kekik esansiyel yağının kullanımında en hızlı gelişme 3904-X4 izolatında gözlenmiştir. Kekik esansiyel yağına karşı en hızlı gelişme 57-03D1 izolatı için 6,82 mm/gün olarak hesaplanmıştır. Kakule ve kekik esansiyel yağlarının 3904-X4 izolatının gelişim hızına etkisi 35-03X1 ve 57-03D1 izolatlarına göre daha fazladır. En düşük gelişme

hızı 1,05 mm/gün ile 57-03D1 izolatına karşı 1,2 µg/mL konsantrasyonda kakule esansiyel yağı kullanımında belirlenmiştir.

Kakule esansiyel yağının *Aspergillus carbonarius* izolatlarına karşı inhibisyon etkisi kekik esansiyel yağına göre daha azdır. 57-03D1 izolatı OTA üretimi bakımından kekik ve kakule esansiyel yağına karşı diğer izolatlardan daha dirençlidir. Kekik esansiyel yağı 3904-X4 izolatının OTA üretimi çalışılan konsantrasyonlarda tamamen engellemiştir.

Çalışmada literatür bulgularına benzer olarak 3904-X4 izolatının kekik ve kakule esansiyel yağları bulunan ortamlarda diğer izolatları göre daha iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir.

Mikotoksinler bazı küfler tarafından üretilen gıdalarda yaygın olarak üretilen düşük molekül ağırlıklı ikincil metabolitlerdir. İnsan ve hayvan sağlığını tehdit etmeleri ve ekonomik kayıp meydana getirmeleri bakımından önemlidirler. Okratoksin A (OTA) *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen önemli bir mikotoksindir. *A. carbonarius*, *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinden olup okratoksin A üreticisi küflerden biridir. Son yıllarda dünya genelinde insan ve hayvan sağlığı için tehlike arz ettiğinden OTA'ya yönelen dikkat artmıştır.

Mikrobiyal kontaminasyonun gıda kaynaklı hastalıklara yol açması ve gıdaların raf ömrünü düşürmesinden dolayı gıda güvenliği önemli bir meseledir. Tüketiciler doğal, fazla işlem görmemiş, en az seviyede kimyasal koruyucu içeren gıda istemektedirler. Esansiyel yağlar doğal olmaları ve toksik olmamalarından dolayı doğal antimikrobiyal maddeler olarak kullanılmaktadırlar. Genel olarak, esansiyel yağlar küflerde misel büyümesini gerileterek mikotoksin üretimini azaltmaktadırlar.

Yapılan çalışmada OTA üretimi açısından çalışılan konsantrasyonlarda *Aspergillus carbonarius* izolatlarına kakule esansiyel yağının kekik esansiyel yağına göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Fakat kullanılan kakule esansiyel yağının miktarı kekik esansiyel yağına göre 10 kat daha fazla olduğundan, kekik esansiyel yağının miktarının artırılmasıyla toksin üretiminin engellenmesinin de artacağı düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmada *Aspergillus carbonarius* izolatlarının gelişmesi ve OTA oluşturmasına kekik ve kakule esansiyel yağlarının antifungal etkisi incelenmiştir. Kakule esansiyel yağı *Aspergillus carbonarius*'a karşı ilk defa değerlendirilmiştir. Kekik esansiyel yağının ileriki çalışmalarda da hem gıda endüstrisi için hem de insan sağlığı açısından önemli bir doğal antimikrobiyal olacağı ileriki çalışmalara ve literatüre katkı sağlayacağı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- Abarca, M. L., Accensi, F., Bragulat, M. R., Castella, G., Cabanes, F. J.** (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *J Food Prot*, **66**(3), 504-506.
- Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J., Cabañes, F. J.** (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, **86**(1), 33-49.
- Abouzied, M. M., Horvath, A. D., Podlesny, P. M., Regina, N. P., Metodiev, V. D., Kamenova-Tozeva, R. M., . . . Ganev, V. S.** (2002). Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Addit Contam*, **19**(8), 755-764.
- Abramson, D.** (1987). Measurement of ochratoxin A in barley extracts by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **391**(0), 315-320.
- Aiko, V.Mehta, A.** (2013). Control of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production with spices in culture medium and rice. *World Mycotoxin Journal*, **6**(1), 43-50.
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., López de Cerain, A.** (2009). Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control*, **20**(4), 326-333.
- Aoudou, Y., Léopold, T. N., Michel, J. D. P., Xavier, E. F., Moses, M. C.** (2010). Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Research*, **1**(1), 001-008.
- Astoreca, A., Barberis, C., Magnoli, C., Combina, M., Dalcero, A.** (2009). Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains on irradiated peanut seeds. *International Journal of Food Microbiology*, **129**(2), 131-135.
- Astoreca, A., Magnoli, C., Ramirez, M. L., Combina, M., Dalcero, A.** (2007). Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. *Int J Food Microbiol*, **119**(3), 314-318.
- Badei, A. Z. M.** (1992). Antimycotic effect of cardamom essential oil against mycotoxigenic molds in relation to its chemical composition. *Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel*, **14**(5/6), 177-182.
- Badei, A. Z. M., El-Akel, A. T. M., Morsi, H. H. H.** (1991). Evaluation of chemical, physical and antimicrobial properties of cardamom essential oil. *Bull. Faculty Agric. University of Cairo*, **42**(1), 183-197.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.** (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**(2), 446-475.
- Bansod, S.Rai, M.** (2008). Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences*, **3**(2), 81-88.
- Basílico, M. Z.Basilico, J. C.** (1999). Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Letters in Applied Microbiology*, **29**(4), 238-241.
- Bondy, G. S.Armstrong, C. L.** (1998). Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived LLC-PK1 and OK cell lines. *Cell Biol Toxicol*, **14**(5), 323-332.
- Bragulat, M., Abarca, M., Cabañes, F.** (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, **71**(2), 139-144.
- Cabañes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellá, G., Minguez, S., Pons, A.** (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*, **79**(3), 213-215.
- Carmo, E. S., Lima, E. d. O., Souza, E. L. d.** (2008). The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, **39**, 362-367.
- Cetin, B., Cakmakci, S., Cakmakci, R.** (2011). The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **35**(2), 145-154.
- da Cruz Cabral, L., Fernández Pinto, V., Patriarca, A.** (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **166**(1), 1-14.
- Dambolena, J. S., López, A. G., Cánepa, M. C., Theumer, M. G., Zygadlo, J. A., Rubinstein, H. R.** (2008). Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. *Toxicon*, **51**(1), 37-44.
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., López, A. G., Rubinstein, H. R., Zygadlo, J. A., Mwangi, J. W., . . . Kariuki, S. T.** (2010). Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **11**(2), 410-414.
- Dambolena, J. S., Zygadlo, J. A., Rubinstein, H. R.** (2011). Antifumonisin activity of natural phenolic compounds: A structure–property–activity relationship study. *International Journal of Food Microbiology*, **145**(1), 140-146.

- de Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessiere, J. M., Fonvieille, J. L., Dargent, R.** (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can J Microbiol*, **47**(1), 9-17.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G.** (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, **74**(1-2), 101-109.
- Dorman, H. J., Deans, S. G.** (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, **88**(2), 308-316.
- EC** (2010). Commission regulation 1881/2006 of February 5, 2010, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A: Official Journal European Union, L 35/8.
- Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., Mount, J. R.** (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J Food Prot*, **64**(7), 1019-1024.
- Elikoğlu, C.** (2013). *Aspergillus niger* agg. ve *Aspergillus carbonarius*'un gelişmesine sıcaklık ve su aktivitesinin etkisinin modellenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Esteban, A., Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Cabañes, F. J.** (2006). Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology*, **23**(7), 634-640.
- Feng, W., Zheng, X.** (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food Control*, **18**(9), 1126-1130.
- Fraternale, D., Giamperi, L., Ricci, D.** (2003). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil Obtained from In Vitro Plants of *Thymus mastichina* L. *Journal of Essential Oil Research*, **15**(4), 278-281.
- Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E., Mandrell, R. E.** (2004). Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(19), 6042-6048.
- Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R. A., Nielsen, K. F.** (2011). Fumonisin and Ochratoxin Production in Industrial *Aspergillus niger* Strains. *PLoS ONE*, **6**(8), e23496.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., Thrane, U.** (2007). Fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(23), 9727-9732.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A., Pitt, J., Samson, R.** (1986). Infrageneric Taxa of *Aspergillus*. In R. Samson & J. Pitt (Eds.), *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* (Vol. 102, pp. 55-62): Springer US.
- Garcia, D., Garcia-Cela, E., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marín, S.** (2011). Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts. *Food Control*, **22**(8), 1378-1384.

- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marin, S.** (2009). Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiol*, **26**(8), 757-769.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P.** (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol*, **124**(1), 91-97.
- Hirasa, K.Takemasa, M.** (1998). Spice science and technology: *CRC Press*.
- Holley, R. A.Patel, D.** (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, **22**(4), 273-292.
- Hong, S.-B., Lee, M., Kim, D.-H., Varga, J., Frisvad, J. C., Perrone, G., . . . Samson, R. A.** (2013). *Aspergillus Luchuensis*, An Industrially Important Black *Aspergillus* In East Asia. *PLoS ONE*, **8**(5), 63769.
- Huff, W. E., Doerr, J. A., Hamilton, P. B., Hamann, D. D., Peterson, R. E., Ciegler, A.** (1980). Evaluation of bone strength during aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Appl Environ Microbiol*, **40**(1), 102-107.
- IARC, I. A. f. R. o. C.** (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.
- Jakowienko, P., Wojcik-Stopczynska, B., Jadczyk, D.** (2011). Antifungal activity of essential oils from two varieties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Vegetable Crops Research Bulletin*, **74**, 97-106.
- Jayasena, D. D.Jo, C.** (2013). Potential Application of Essential Oils as Natural Antioxidants in Meat and Meat Products: A Review. *Food Reviews International*, **30**(1), 71-90.
- Jiang, C., Shi, J., Liu, Y., Zhu, C.** (2014). Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. *Food Control*, **35**(1), 41-48.
- Joosten, H. M., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M., Bucheli, P.** (2001). Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *Int J Food Microbiol*, **65**(1-2), 39-44.
- Kabak, B.Dobson, A. D.** (2009). Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *J Food Prot*, **72**(9), 2006-2016.
- Kapetanakou, A. E., Ampavi, A., Yanniotis, S., Drosinos, E. H., Skandamis, P. N.** (2011). Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in vitro and evaluation in food matrices of different viscosity. *Food Microbiology*, **28**(4), 727-735.
- Karbancıoğlu-Güler, F.** (2008). *İncirde Okratoksin A ve fumonisin oluşumunun incelenmesi*. Doktora Tezi. İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Karbancıoğlu-Güler, F.Heperkan, D.** (2008). Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs. *Analytica Chimica Acta*, **617**(1-2), 32-36.

- Katooli N., Maghsodlo R., Honari H., S.E, R.** (2012). Fungistatic activity of Essential oil of Thyme and Eucalyptus against of Postharvest and soilborne Plant Pathogenic fungi. *Global Journal of Medicinal Plant Research*, **1**(1), 1-4.
- Khosravi, A. R., Shokri, H., Minooeianhaghighi, M.** (2011). Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus parasiticus* by *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides*, and *Nigella sativa* essential oils. *Foodborne Pathogens and Disease*, **8**(12), 1275-1280.
- Kocić-Tanackov, S., Dimić, G., Tanackov, I., Pejin, D., Mojović, L., Pejin, J.** (2012). The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus* spp. and on sterigmatocystin biosynthesis. *LWT - Food Science and Technology*, **49**(1), 14-20.
- Kusters-van Someren, M., Samson, R., Visser, J.** (1991). The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics*, **19**(1), 21-26.
- Küçükakar, P.** (2014). *Sıcaklık ve su aktivitesinin Aspergillus carbonarius'un gelişme ve okratoksin oluşturmaya üzerine etkisinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Lea, T., Steien, K., Stormer, F. C.** (1989). Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, **107**(2-3), 153-159.
- Li, X., Xing, Y., Jiang, Y., Ding, Y., Li, W.** (2009). Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. *International Journal of Food Science & Technology*, **44**(11), 2161-2168.
- Liu, X., Wang, L. P., Li, Y. C., Li, H. Y., Yu, T., Zheng, X. D.** (2009). Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo. *J Appl Microbiol*, **107**(5), 1450-1456.
- Logrieco, A., Ferracane, R., Haidukowsky, M., Cozzi, G., Visconti, A., Ritieni, A.** (2009). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **26**(11), 1495-1500.
- Logrieco, A., Ferracane, R., Visconti, A., Ritieni, A.** (2010). Natural occurrence of fumonisin B2 in red wine from Italy. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **27**(8), 1136-1141.
- López-Malo, A., Maris Alzamora, S., Palou, E.** (2005). *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, **99**(2), 119-128.
- Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., Mexia, A.** (2006). Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, **23**(3), 176-178.
- Maruzzella, J. C. Liguori, L.** (1958). The in vitro antifungal activity of essential oils. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, **47**(4), 250-254.

- Mihaliak, C., Gershenzon, J., Croteau, R.** (1991). Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants: implications for theories of plant chemical defense. *Oecologia*, **87**(3), 373-376.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B., Matavulj, M.** (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med*, **69**(5), 413-419.
- Mitchell, T. C., Montenegro Stamford, T. L., Leite de Souza, E., Oliveira Lima, E. d., Santos Carmo, E.** (2010). *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic aspergilli. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, **30**(3), 755-760.
- Mutlu-Ingok, A.Karbancioglu-Guler, F.** (2014). Effect of Temperature on the Growth and Ochratoxin A Production of the *Aspergillus* section *Nigri* Members Isolated from Dried Figs. *Journal of Food Safety*, **34**(4), 333-339.
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M., Ueno, Y.** (1997). Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, **9**(2), 77-83.
- Nguefack, J., Leth, V., Amvam Zollo, P., Mathur, S.** (2004). Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, **94**(3), 329-334.
- Nielsen, K., Mogensen, J., Johansen, M., Larsen, T., Frisvad, J.** (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **395**(5), 1225-1242.
- Nogueira, J. H. C., Gonçalves, E., Galletti, S. R., Facanali, R., Marques, M. O. M., Felício, J. D.** (2010). *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology*, **137**(1), 55-60.
- Ownagh, A. O., Hasani, A., Mardani, K., Ebrahimzadeh, S.** (2012). *Antifungal Effects of Thyme, Agastache and Satureja Essential Oils on Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus and Fusarium solani*. Paper presented at the Veterinary Research Forum.
- Pandey, D. K., Tripathi, N. N., Tripathi, R. D., Dixit, S. N.** (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Caesulia axillaris* Roxb. (Compositae). *Journal of Applied Botany and Food Quality/Angewandte Botanik*, **56**, 256-257.
- Passone, M. A., Girardi, N. S., Etcheverry, M.** (2012). Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *International Journal of Food Microbiology*, **159**(3), 198-206.

- Patino, B., Gonzalez-Salgado, A., Gonzalez-Jaen, M., Vazquez, C.** (2005). PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *Int J Food Microbiol*, **104**(2), 207-214.
- Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J. C., Samson, R. A.** (2011). *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*, **115**(11), 1138-1150.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R. A.** (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res*, **51**(1), 61-99.
- Pitt, J. I.** (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Med Mycol*, **38 Suppl 1**, 17-22.
- Ponsone, M. L., Chiotta, M. L., Palazzini, J. M., Combina, M., Chulze, S.** (2012). Control of Ochratoxin A Production in Grapes. *Toxins*, **4**(5), 364-372.
- Raper, K. B., Fennell, D. I.** (1965). The Genus *Aspergillus*: *Williams & Wilkins*.
- Rasooli, I., Rezaei, M. B., Allameh, A.** (2006). Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*, **17**(5), 359-364.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., Khalel, K. I.** (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, **44**, 437-445.
- Romero, S. M., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., Vaamonde, G.** (2007). Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *International Journal of Food Microbiology*, **115**(2), 140-143.
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J.** (2006). Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia*, **77**(4), 279-285.
- Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., Yuk, H.-G.** (2013). Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **54**(5), 625-644.
- Shukla, N. K., Shukla, E.** (2013). To study the Antifungal Activity of Indian Spices against *Aspergillus Niger* and *Trichoderma Reesei*. *International Journal*.
- Silva, F. C. d., Chalfoun, S. M., Siqueira, V. M. d., Botelho, D. M. d. S., Lima, N., Batista, L. R.** (2012). Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **22**, 1002-1010.
- Singh, G., Kapoor, I. P. S., Singh, P., de Heluani, C. S., de Lampasona, M. P., Catalan, C. A. N.** (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, **46**(10), 3295-3302.

- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., Welsh, M. J.** (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, **417**(6888), 552-555.
- Sokolic-Mihalak, D., Frece, J., Slavica, A., Delas, F., Pavlovic, H., Markov, K.** (2012). The effects of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oil components against ochratoxin-producing aspergilli. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, **63**(4).
- Soliman, K. M. Badeaa, R. I.** (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, **40**(11), 1669-1675.
- Souza, E. L. d., Lima, E. d. O., Freire, K. R. d. L., Sousa, C. P. d.** (2005). Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **48**, 245-250.
- Speijers, G. J. A. van Egmond, H. P.** (1993). Human Ochratoxicosis and Its Pathologies: *Worldwide Ochratoxin A Levels in Food and Feeds In., John Libbey Euroto Ltd.: Montrouge, France.*
- TGK** (2011). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği: Yayımlandığı Resmi Gazete, 29.12.2011-28157.
- Thosar, N., Basak, S., Bahadure, R. N., Rajurkar, M.** (2013). Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study. *European Journal of Dentistry*, **7**(Suppl 1), S71-S77.
- Thyagaraja, N. Hosono, A.** (1996). Effect of Spice Extract on Fungal Inhibition. *LWT - Food Science and Technology*, **29**(3), 286-288.
- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., Theron, J. J.** (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, **205**(976), 1112-1113.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J. A.** (2007). Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*, **27**(1), 91-101.
- Wanchaitanawong, P., Chaungwanit, P., Poovarodom, N., Nitisinprasert, S.** (2005). In vitro antifungal activity of Thai herb and spice extracts against food spoilage fungi. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, **39**, 400-405.
- Yamamoto-Ribeiro, M. M. G., Grespan, R., Kohiyama, C. Y., Ferreira, F. D., Mossini, S. A. G., Silva, E. L., . . . Machinski Junior, M.** (2013). Effect of Zingiber officinale essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. *Food Chemistry*, **141**(3), 3147-3152.
- Zabka, M., Pavela, R., Slezakova, L.** (2009). Antifungal effect of Pimenta dioica essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, **30**(2), 250-253.

EKLER

EK A : Varyans Analiz Çizelgeleri.

EK B : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Sonuç Kromatogramları Örnekleri.

EK A : Varyans Analiz Çizelgeleri.

Çizelge A.1 : *Aspergillus carbonarius* 35-03X1 izolatının gelişmesine kekik esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Konsantrasyon	0,584	3	0,195	35,676	0,000
Hata	0,038	7	0,005		
Toplam	0,622	10			

Çizelge A.2 : *Aspergillus carbonarius* 39-04X4 izolatının gelişmesine kekik esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Konsantrasyon	142,626	4	35,657	34,398	0,000
Hata	7,256	7	1,037		
Toplam	149,882	11			

Çizelge A.3 : *Aspergillus carbonarius* 57-03D1 izolatının gelişmesine kekik esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Konsantrasyon	60,933	3	20,311	56,483	0,000
Hata	2,158	6	0,360		
Toplam	63,091	9			

Çizelge A.4 : *Aspergillus carbonarius* 35-03X1 izolatının gelişmesine kakule esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Konsantrasyon	2,155	1	2,155	1,367	0,327
Hata	4,729	3	1,576		
Toplam	6,884	4			

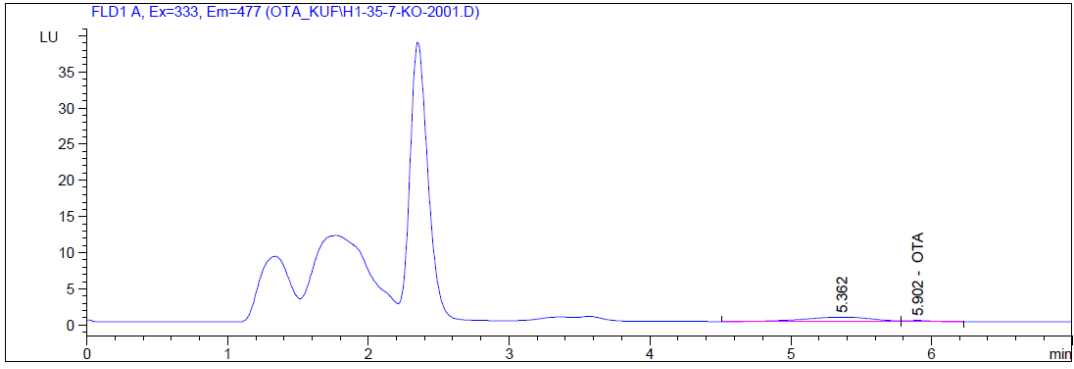
Çizelge A.5 : *Aspergillus carbonarius* 39-04X4 izolatının gelişmesine kakule esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Konsantrasyon	98,620	8	12,327	22,758	0,000
Hata	5,417	10	0,542		
Toplam	104,036	18			

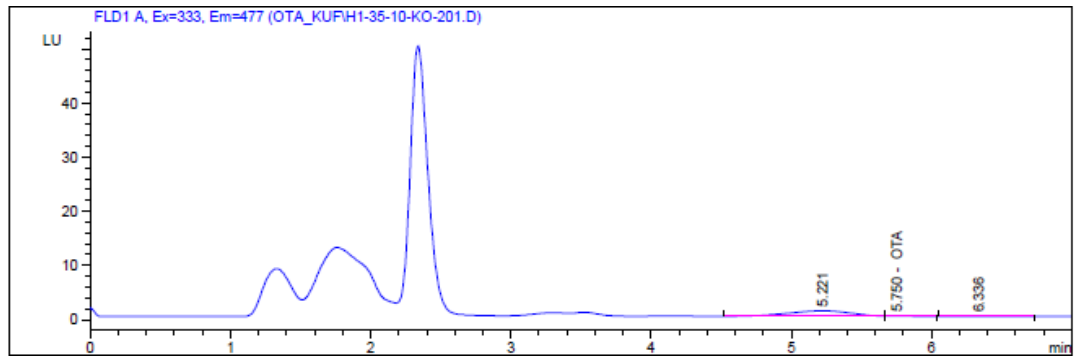
Çizelge A.6 : *Aspergillus carbonarius* 57-03D1 izolatının gelişmesine kakule esansiyel yağı konsantrasyonunun etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Konsantrasyon	82,577	4	20,644	36,274	0,000
Hata	3,984	7	0,569		
Toplam	86,561	11			

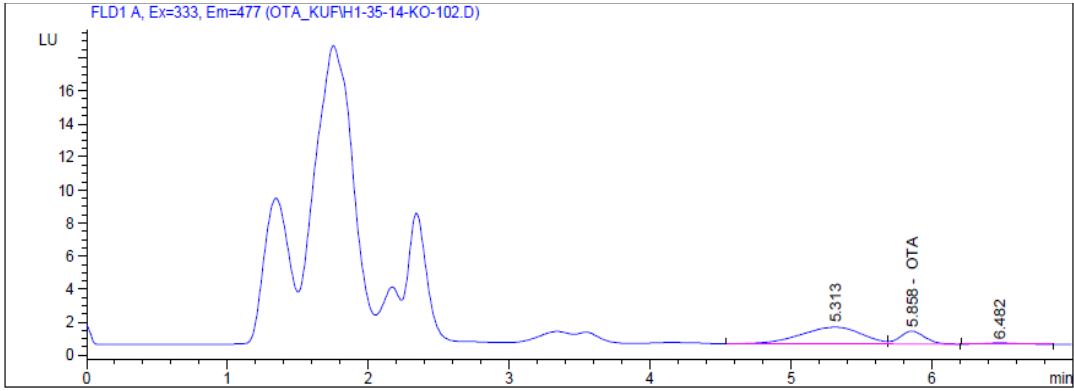
EK B : Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Sonuç Kromatogramları Örnekleri



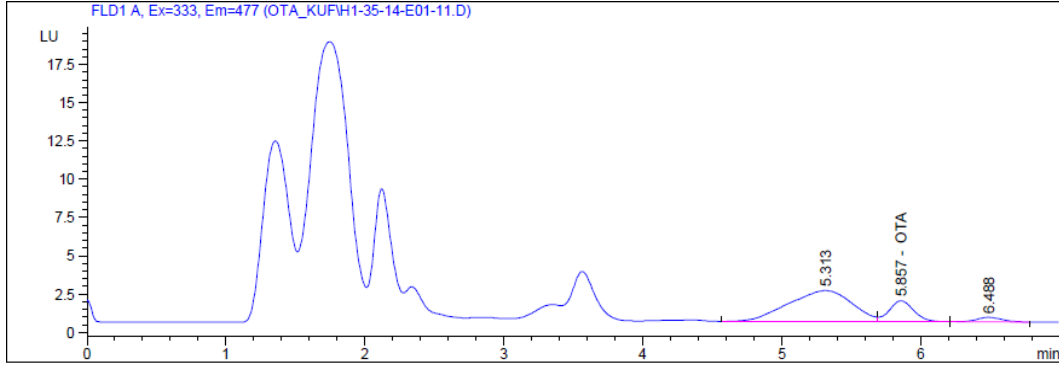
Şekil B.1 : 35-03X1 nolu izolatin kontrol örneğinin 7.güne ait kromatogramı.



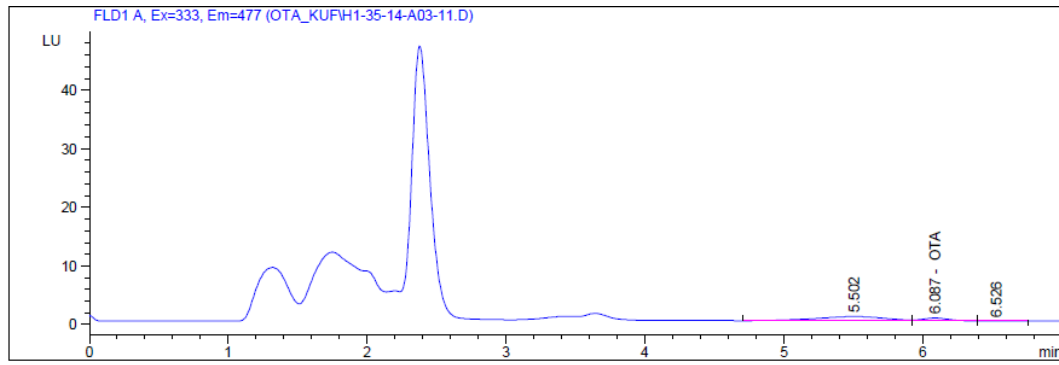
Şekil B.2 : 35-03X1 nolu izolatin kontrol örneğinin 10.güne ait kromatogramı.



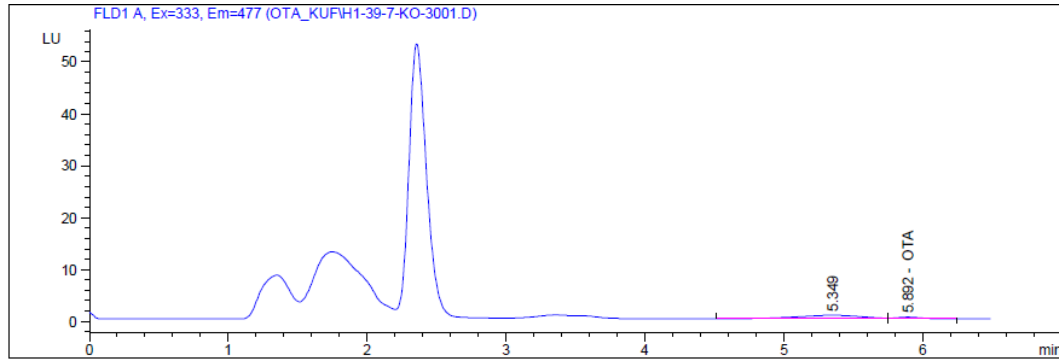
Şekil B.3 : 35-03X1 nolu izolatin kontrol örneğinin 14.güne ait kromatogramı.



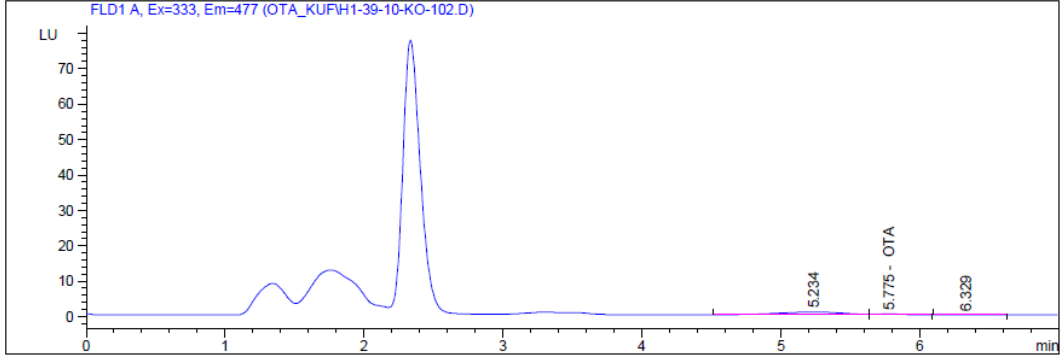
Şekil B.4 : 35-03X1 nolu izolatin kekik esansiyel yağı 0,01 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.



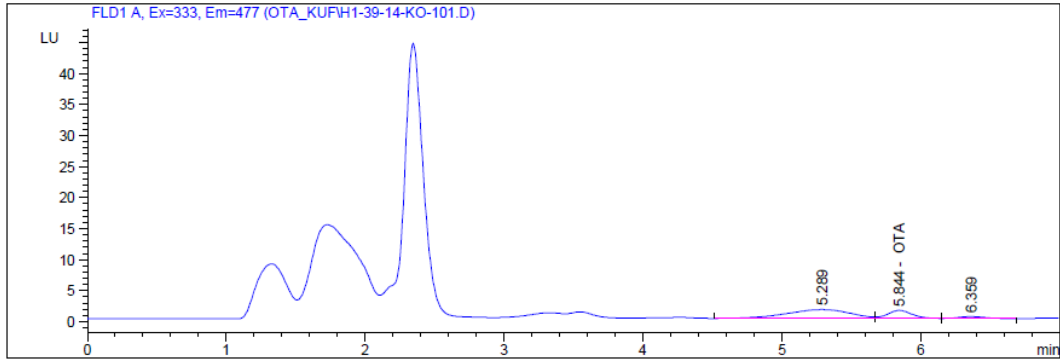
Şekil B.5 : 35-03X1 nolu izolatin kakule esansiyel yağı 0,3 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.



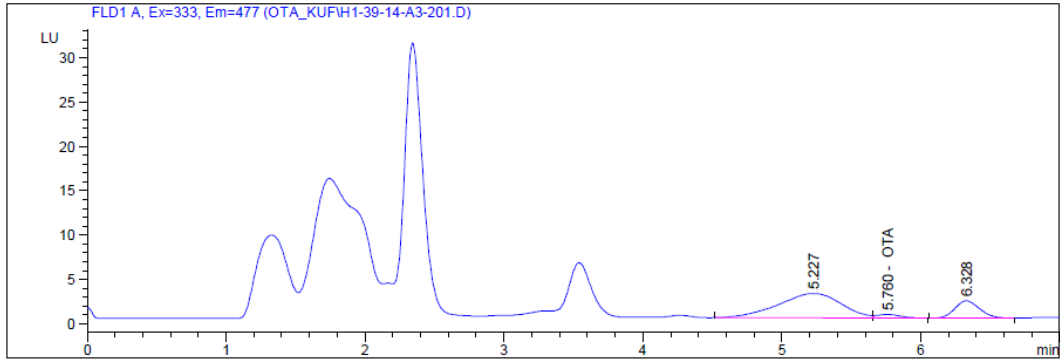
Şekil B.6 : 39-04X4 nolu izolatin kontrol örneğinin 7.güne ait kromatogramı.



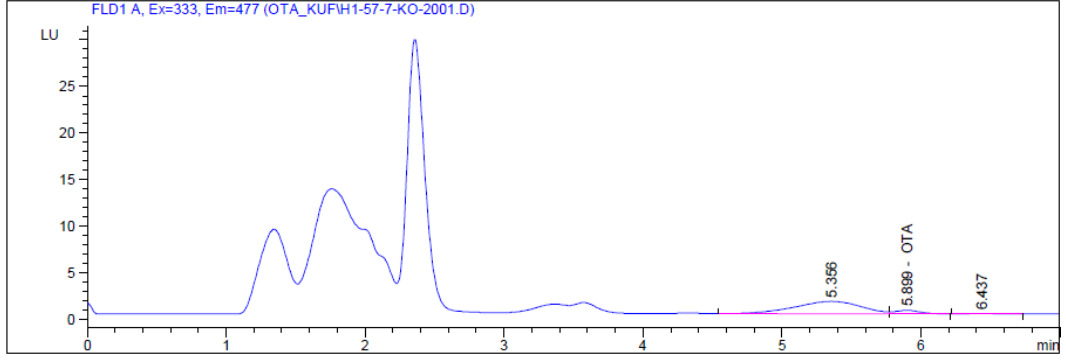
Şekil B.7 : 39-04X4 nolu izolatin kontrol örneğinin 10.güne ait kromatogramı.



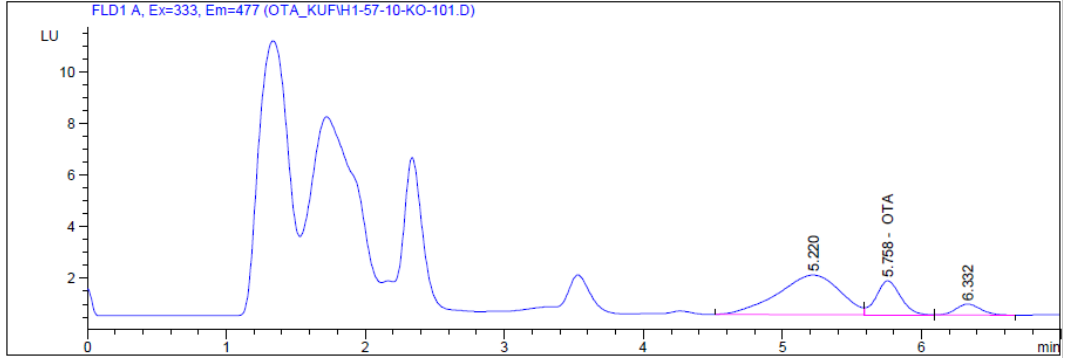
Şekil B.8 : 39-04X4 nolu izolatin kontrol örneğinin 14.güne ait kromatogramı.



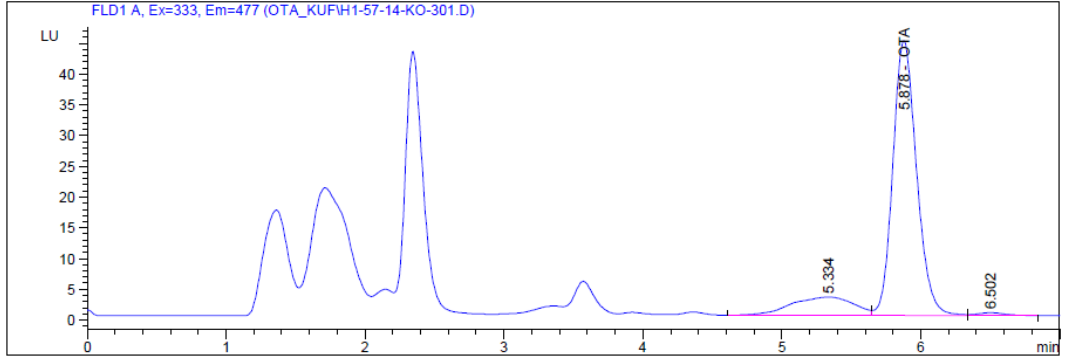
Şekil B.9 : 39-04X4 nolu izolatin kakule esansiyel yağı 0,3 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.



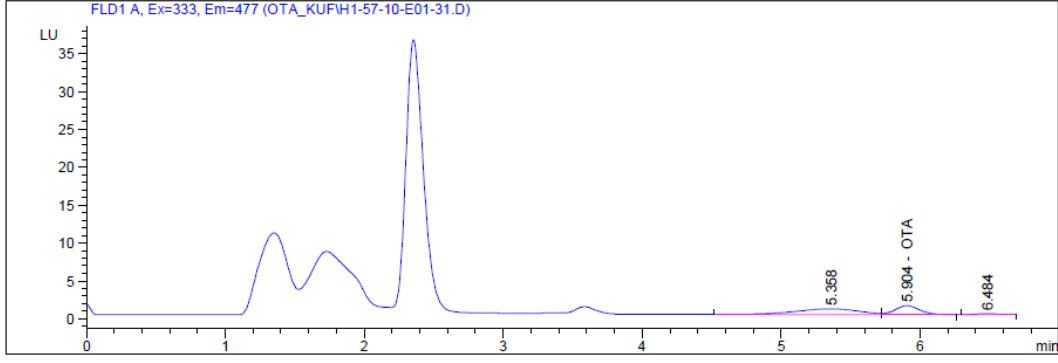
Şekil B.10 : 57-03D1 nolu izolatin kontrol örneğinin 7.güne ait kromatogramı.



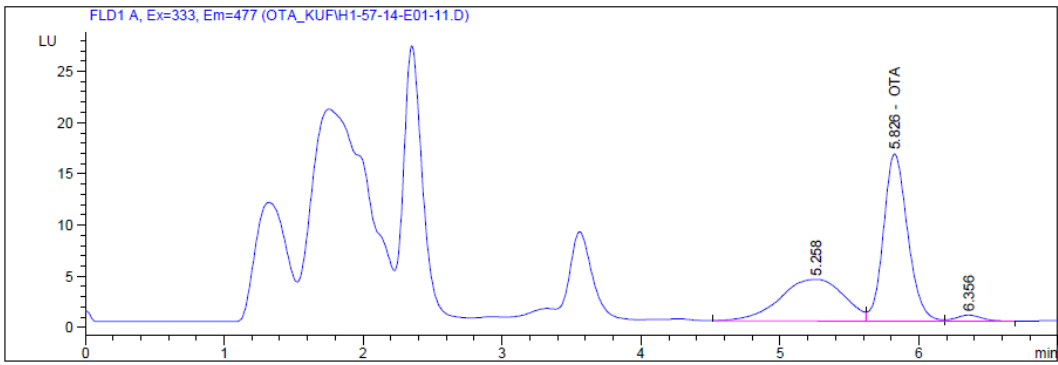
Şekil B.11 : 57-03D1 nolu izolatin kontrol örneğinin 10.güne ait kromatogramı.



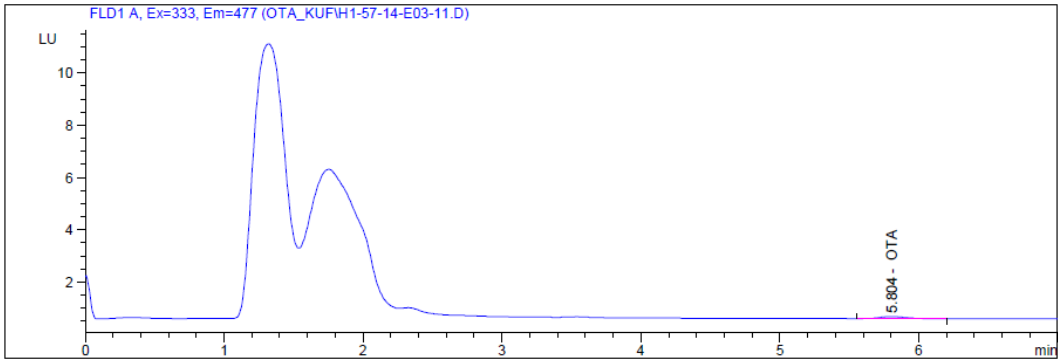
Şekil B.12 : 57-03D1 nolu izolatin kontrol örneğinin 14.güne ait kromatogramı.



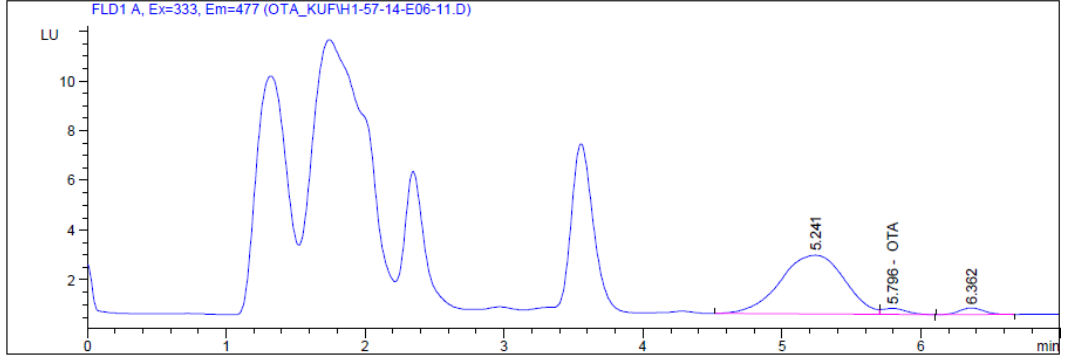
Şekil B.13 : 57-03D1 nolu izolatın kekik esansiyel yağı 0,01 µg/ml konsantrasyonu 10.güne ait kromatogramı.



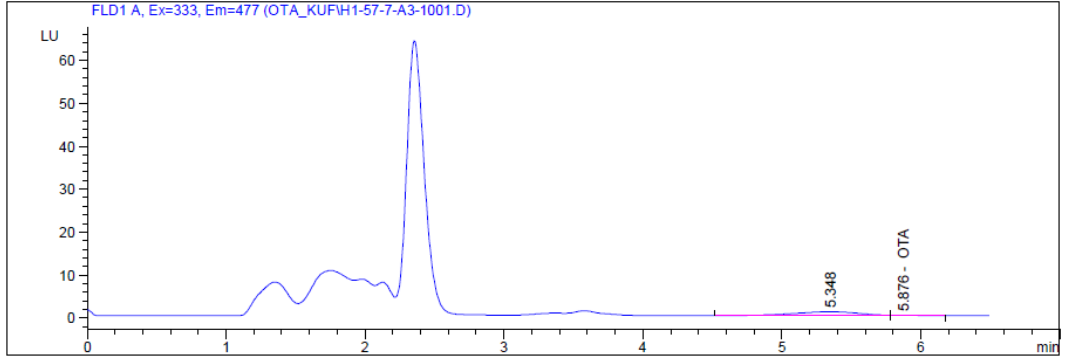
Şekil B.14 : 57-03D1 nolu izolatın kekik esansiyel yağı 0,01 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.



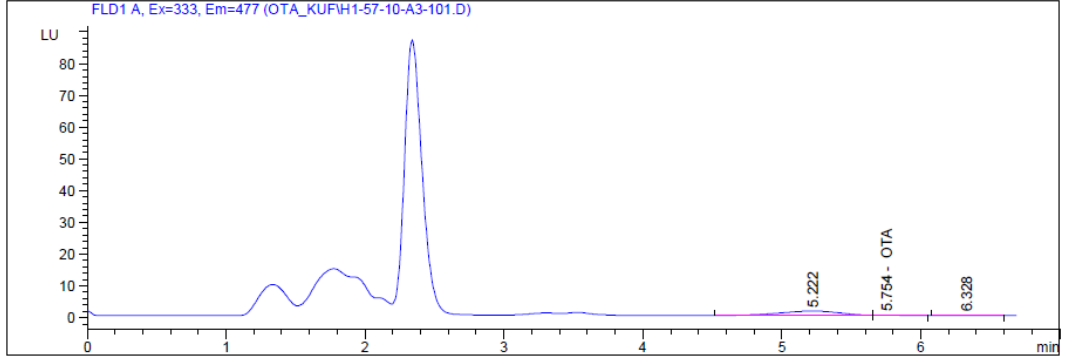
Şekil B.15 : 57-03D1 nolu izolatın kekik esansiyel yağı 0,03 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.



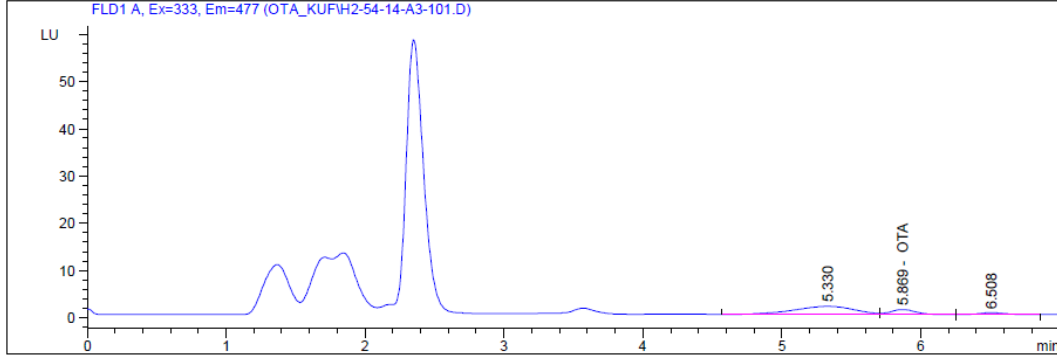
Şekil B.16 : 57-03D1 nolu izolatin kekik esansiyel yağı 0,06 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.



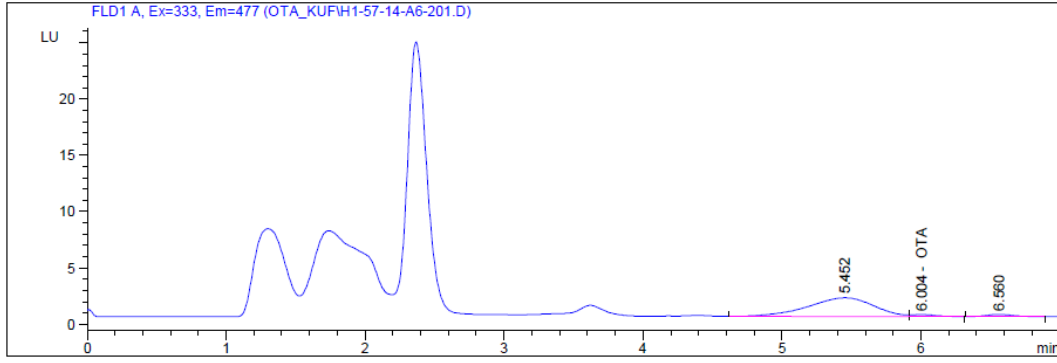
Şekil B.17 : 57-03D1nolu izolatin kakule esansiyel yağı 0,3 µg/ml konsantrasyonu 7.güne ait kromatogramı.



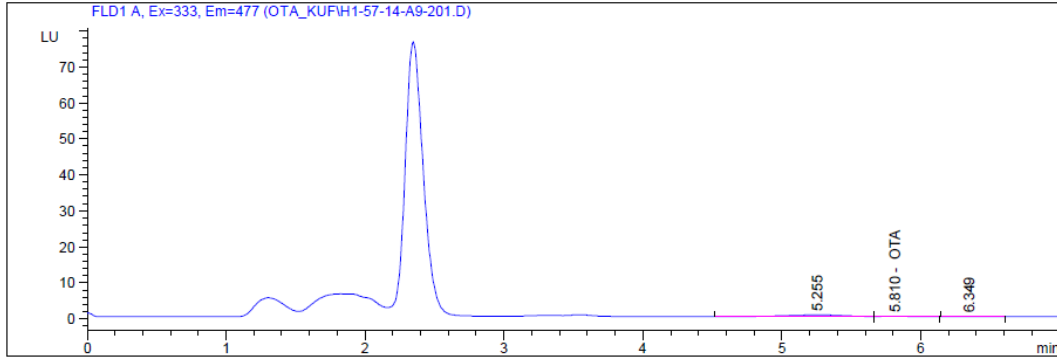
Şekil B.18 : 57-03D1 nolu izolatin kakule esansiyel yağı 0,3 µg/ml konsantrasyonu 10.güne ait kromatogramı.



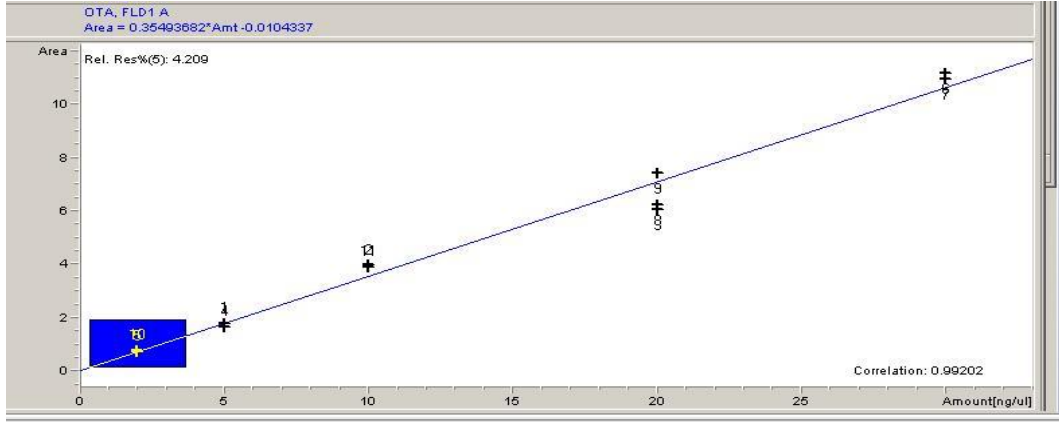
Şekil B.19 : 57-03D1 nolu izolatın kakule esansiyel yağı 0,3 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.



Şekil B.20 : 57-03D1 nolu izolatın kakule esansiyel yağı 0,6 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.



Şekil B.21 : 57-03D1 nolu izolatın kakule esansiyel yağı 0,9 µg/ml konsantrasyonu 14.güne ait kromatogramı.



Şekil B.22 : Okratoksin A kalibrasyon grafiği.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Hilâl Nur YAVUZ

Doğum Yeri ve Tarihi: Meram/1988

E-Posta: hlly365@hotmail.com

Lisans: Selçuk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Mesleki Deneyim ve Ödüller

İzi Süt, Stajyer, 07/2010-08/2010