

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

133152

**ARPA, MALT VE BİRADA OKRATOKSİN A (OTA) VARLIĞI ve
BİRA ÜRETİMİ SİRASINDA OTA'NIN MAYA TARAFINDAN
PARÇALANMASI**

Tuncay GÜMÜŞ

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet DEMİRCİ

TEKİRDAĞ, 2002

133152
**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

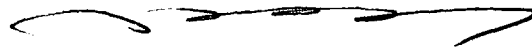
**ARPA, MALT VE BİRADA OKRATOKSİN A (OTA) VARLIĞI VE
BİRA ÜRETİMİ SIRASINDA OTA'NIN MAYA TARAFINDAN
PARÇALANMASI**

Tuncay GÜMÜŞ

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

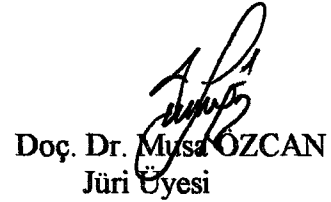
Bu tez 26/12/2002 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Mehmet DEMİRCİ
Danışman



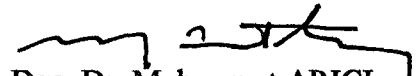
Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Musa ÖZCAN
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Nuray ÖZER
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Muhammet ARICI
Jüri Üyesi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÇİZELGELER LİSTESİ	I
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
RESİMLER LİSTESİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	X
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	6
2.1.Okratoksinin Yapısı ve Özellikleri	6
2.2. Okratoksin Üreten Küfler ve Gelişme Şartları	8
2.3.Okratoksinin Sağlık Üzerine Etkisi	11
2.4.Okratoksinlerin Arpa, Malt ve Birada Bulunuşu	15
2.5. Okratoksin A'nın Alkol Fermentasyonundaki Durumu	20
2.6. Bira Tüketimine Bağlı İntoksikasyonlar	23
2.7. OTA ile ilgili yasal düzenlemeler	24
3. MATERYAL VE METOD	27
3.1. Materyal	27
3.2. Metod	28
3.2.1. Okratoksin A Analizi (Elisa Metodu)	28
3.2.1.1. Arpa ve Malt Örneklerinin Analize Hazırlanması	28
3.2.1.2. Arpa ve Maltlarda Okratoksin A (OTA) Analizi	28
3.2.1.3. Biralarda Okratoksin A (OTA) Analizi	29
3.2.2. Okratoksin A'nın Maya Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	29
3.2.3 Okratoksin A'nın Bira Fermentasyonundaki Durumunun Belirlenmesi	29
3.2.4. Alkol Miktarının Belirlenmesi	30

3.2.5. Titrasyon Asitliğinin Belirlenmesi	30
3.2.6. pH Değerlerinin Belirlenmesi	30
3.2.7. Toplam Şeker (%) Oranının Belirlenmesi	31
3.2.8. Suda Çözünür Kuru Madde İçeriğinin (Briks) Belirlenmesi	32
3.2.9. Maya Sayısının Belirlenmesi	32
3.2.10. İstatiksel Analizler	32
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA	33
4.1. Arpa Örneklerinde Okratoksin A Bulunuşu	33
4.2. Malt Örneklerinde Okratoksin A Bulunuşu	36
4.3. Bira Örneklerinde Okratoksin A Bulunuşu	39
4.4. Okratoksin A'nın Bira Mayasına Etkisi	46
4.5. Bira Fermentasyonunun OTA'ya Etkisi	50
4.6. Fermentasyon Süresince Maya Sayısında Meydana Gelen Değişiklikler	55
4.7. Fermentasyon Süresince pH Değerinde Meydana Gelen Değişiklikler	62
4.8. Fermentasyon Süresince Asitlikte (%) Meydana Gelen Değişiklikler	67
4.9. Fermentasyon Süresince Alkol (%) Miktarında Meydana Gelen Değişiklikler	72
4.10. Fermentasyon Süresince Su İçerisinde Çözünür Kurumadde (Brix) Oranında (%) Meydana Gelen Değişiklikler	77
4.11. Fermentasyon Süresince Toplam Şeker Oranında (%) Meydana Gelen Değişiklikler	82
4. SONUÇ ve ÖNERİLER	88
5. KAYNAKLAR	91
6. EKLER	110
7. TEŞEKKÜR	113
8. ÖZGEÇMİŞ	114

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Okratoksinin canlılar üzerine etkisi	11
Çizelge 2.2. Ülkelere göre kişi başına bira tüketimi	23
Çizelge 2.3. Bazı ülkelerdeki gıda ve yemlerdeki OTA için verilen maksimum tolere edilebilir değerler	25
Çizelge 4.1. Arpa örneklerinde bulunan OTA miktarları	33
Çizelge 4.2. Arpa örneklerine ait varyans analiz sonuçları	34
Çizelge 4.3. Arpa örneklerine ait Duncan testi sonuçları	35
Çizelge 4.4. Malt örneklerinde OTA miktarları	36
Çizelge 4.5. Malt örneklerine ait varyans analiz sonuçları	37
Çizelge 4.6. Malt örneklerine ait Duncan testi sonuçları	38
Çizelge 4.7a. Bira örneklerinde bulunan OTA miktarları	39
Çizelge 4.7b. Bira örneklerinde bulunan OTA miktarları	40
Çizelge 4.7c. Bira örneklerinde bulunan OTA miktarları	41
Çizelge 4.8. Bira örneklerine ait varyans analiz sonuçları	44
Çizelge 4.9. Bira örneklerine ait Duncan testi sonuçları	45
Çizelge 4.10. Agar difüzyon yönteminde OTA konsantrasyonuna göre oluşan zon çapları	46
Çizelge 4.11. Zon çapları arasındaki farklılıklara ilişkin varyans analiz sonuçları	48
Çizelge 4.12. OTA miktarlarına göre standartların zon çaplarının Duncan testi sonuçları	48
Çizelge 4.13. Bira fermentasyonu süresince OTA'nın durumu	50
Çizelge 4.14. Fermentasyon süresince Okratoksin A'daki değişime ilişkin varyans analiz tablosu	51
Çizelge 4.15. Fermentasyon süresince Okratoksin A miktarlarına göre örnekler arasındaki Duncan testi sonuçları	52
Çizelge 4.16. Örneklerin OTA miktarlarına göre fermentasyon sürelerinin Duncan testi sonuçları	52
Çizelge 4.17. Örneklerin OTA konsantrasyonlarına göre fermentasyon süresi örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları	54

Çizelge 4.18. Fermentasyon süresince maya sayısındaki meydana gelen değişiklikler	55
Çizelge 4.19. Fermentasyon süresince maya sayısındaki değişime ilişkin varyans analizi	56
Çizelge 4.20. Fermentasyon süresince örnekler arasındaki maya sayılarına göre duncan testi sonuçları	57
Çizelge 4.21. Örneklerin fermentasyon süresince OTA miktarlarına göre Duncan testi sonuçları	59
Çizelge 4.22. Örneklerin maya sayılarına göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları	61
Çizelge 4.23. Fermentasyon süresince pH değerlerinde meydana gelen değişiklikler	62
Çizelge 4.24. Fermentasyon süresince pH'daki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları	63
Çizelge 4.25. Fermentasyon süresince pH değerlerine göre örnekler arasındaki Duncan testi sonuçları	64
Çizelge 4.26. Örneklerin pH değerlerine göre fermentasyon süresince Duncan testi sonuçları	64
Çizelge 4.27. Örneklerin pH değerlerine göre fermentasyon süresi örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları	66
Çizelge 4.28. Fermentasyon süresince % asitlikte meydana gelen değişiklikler	67
Çizelge 4.29. Fermentasyon süresince asitlik (%) değerindeki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları	68
Çizelge 4.30. Fermentasyon süresince örnekler arasındaki % asitlik (laktik asit cinsinden) değerlerine göre Duncan testi sonuçları	69
Çizelge 4.31. Örneklerin % asitlik değerlerine göre fermentasyon sürelerinin Duncan testi sonuçları	69
Çizelge 4.32. Örneklerin % asitlik değerlerine göre fermentasyon süresi örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları	71
Çizelge 4.33. Fermentasyon süresince % alkol miktarında meydana gelen değişiklikler	72

Çizelge 4.34. Fermentasyon süresince alkol oranlarındaki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları	73
Çizelge 4.35. Fermentasyon süresince örnekler arasındaki alkol oranlarına (%) göre Duncan testi sonuçları	74
Çizelge 4.36. Örneklerin alkol oranlarına göre fermentasyon sürelerinin Duncan testi sonuçları	74
Çizelge 4.37. Örneklerin alkol oranlarına göre fermentasyon süresi örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları	76
Çizelge 4.38. Fermentasyon süresince brix değerinde meydana gelen değişiklikler	77
Çizelge 4.39. Fermentasyon Brix değerlerindeki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları	78
Çizelge 4.40. Fermentasyon süresince brix değerlerine göre örnekler arasındaki Duncan testi sonuçları	79
Çizelge 4.41. Örneklerin brix değerlerine göre fermentasyon süresin Duncan testi sonuçları	79
Çizelge 4.42. Örneklerin % su içerisinde çözünür kurumaddeye (Brix) göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları	81
Çizelge 4.43. Fermentasyon süresince % şeker oranında meydana gelen değişiklikler	82
Çizelge 4.44. Fermentasyon süresince % şeker oranlarındaki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları	84
Çizelge 4.45. Fermentasyon süresince % şeker miktarlarına göre örnekler arasındaki Duncan testi sonuçları	85
Çizelge 4.46. Örneklerin % şeker miktarlarına göre fermentasyon süresindeki farklılıkların Duncan testi sonuçları	85
Çizelge 4.47. Örneklerin % şeker oranlarına göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları	87
Ek 2 Çizelge 1. Fermentasyon süresi boyunca örneklerdeki değişikliklerin korelasyonu	112

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı ve ilgili metabolitleri	7
Şekil 3.1. Okratoksin A Analizi İçin Örnek Hazırlama Metodu	27
Şekil 4.1. OTA konsantrasyonlarına göre arpa örneklerinin dağılımı	34
Şekil 4.2. OTA konsantrasyonlarına göre malt örneklerinin dağılımı	37
Şekil 4.3. OTA konsantrasyonlarına göre yerli bira örneklerinin dağılımı	42
Şekil 4.4. OTA konsantrasyonlarına göre ithal bira örneklerinin dağılımı	43
Şekil 4.5 OTA'nın konsantrasyonlarına göre bütün bira örneklerinde dağılımı	43
Şekil 4.6. Fermentasyon süresince OTA miktarında meydana gelen değişiklikler	51
Şekil 4.7. Fermentasyon süresince maya sayılarındaki meydana gelen değişiklikler	56
Şekil 4.8. Duncan testine göre A grubu örnekler ile B grubu örneklerin maya sayılarının ortalamasının genel ortalamadan sapma miktarları	58
Şekil 4.9. Fermentasyon süresince pH değerinde meydana gelen değişiklikler	63
Şekil 4.10. Fermentasyon süresince asitlikte (%) meydana gelen değişiklikler	68
Şekil 4.11. Fermentasyon süresince alkol oranında meydana gelen değişiklikler	73
Şekil 4.12. Fermentasyon süresince brix değerinde meydana gelen değişiklikler	78
Şekil 4.13. Fermentasyon süresince şeker oranlarında meydana gelen değişiklikler	83
Şekil 4.14. Fermentasyon süresince şeker-alkol ilişkisi	84
Ek 1 Şekil 1. Analizlere ait standart kurve örnekleri	110
Ek 1 Şekil 2. Analizlere ait standart kurve örnekleri	111

RESİMLER LİSTESİ

Sayfa

Resim 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki OTA'nın mayalar üzerine etkisi

47



KISALTMALAR

ATA	: Alimentary Toxic Aleukia
BEN	: Balkan Endemik Nefropati
OTA	: Okratoksin A
OTB	: Okratoksin B
OTC	: Okratoksin C
IARC	: International Agency Research Cancer
BRI	: Brewing International Research
WHO	: World Health Organization
FAO	: Food and Agricultural Organization of the United Nations
FDA	: Food and Drug Administration
PTWI	: Provisional Tolerable Weekly Intake
PTDI	: Provisional Tolerable Daily Intake
LD₅₀	: Lethal dosis
a_w	: Su aktivitesi
hL	: hektolitre
µg/kg	: mikrogram/kilogram (ppb)
µg/l	: mikrogram/litre (ppb)
ng/g	: nanogram/gram (ppb)
ng/ml	: nanogram/mililitre (ppb)
mg/kg	: miligram/kilogram (ppm)
pg/ml	: pico gram/mililitre (ppt)

ÖZET

ARPA, MALT VE BİRADA OKRATOKSİN A (OTA) VARLIĞI ve BİRA ÜRETİMİ SIRASINDA OTA'NIN MAYA TARAFINDAN PARÇALANMASI

Arpa, malt ve birada Okratoksin A (OTA) varlığı Elisa metodu kullanılarak araştırılmış, konsantrasyona bağlı olarak bira fermentasyonu süresince OTA miktarında, maya sayısında, pH, % asitlik ve Brix değerlerinde, % toplam şeker miktarında ve % alkol oranında meydana gelen değişiklikler tespit edilmiştir.

15'i ithal olmak üzere toplam 150 adet bira örneği Tekirdağ İl merkezinde tesadüf örnekleme yöntemine göre alınmıştır. 30 farklı arpa örneği Bahri Dağdaş Milletlerarası Kışlık Hububat Araştırma merkezinden ve 25 farklı malt örneği 3 farklı firmadan temin edilmiştir.

Toplam 30 adet arpa örneğinin 27'sinde OTA miktarı 0,22 ile 12,0 ppb arasında olup ortalama, 4,78 ppb olarak tespit edilmiştir. OTA, arpa örneklerinin % 16,7'sinde 3 ppb'nin altında, % 23,3'ünde 3-5 ppb arasında ve % 50'sinde ise 5 ppb'nin üzerinde tespit edilmiştir.

25 adet malt örneğinin sadece 1'inde OTA tespit edilemezken, 24 adet örnekte (% 96) 0,2 ile 6,6 ppb arasında OTA tespit edilmiştir. OTA tespit edilen örneklerin % 40'ında 3 ppb'nin altında OTA bulunurken, % 44'ünde 3-5 ppb arasında ve % 16'sında ise 5 ppb'nin üzerinde OTA tespit edilmiştir.

135 adet yerli ve 15 adet ithal olmak üzere toplam 150 bira örneğinin 53'ünde (% 35,34) 0,01 ile 8,10 ppb arasında OTA tespit edilirken, 97 (% 64,66) adet bira örneğinde ise OTA bulunamamıştır. Bira örneklerinin 1 tanesinde 5 ppb'nin üzerinde OTA belirlenirken 7 adet yerli ve 2 adet ithal bira olmak üzere toplam 9 bira örneğinde 3-5 ppb arasında OTA bulunmuştur.

OTA'nın bira mayası üzerine etkisini tespit etmek için agar difüzyon yöntemi kullanılmış, OTA konsantrasyonu arttıkça mayanın gelişiminin yavaşladığı tespit edilmiştir.

Farklı oranlarda OTA ile kontamine edilen mayşede fermentasyon süresince OTA seviyelerindeki değişiklikler kaydedilmiştir. Buna göre yaklaşık 10 ppb OTA ilave edilen örnekte (A) fermentasyon sonunda (10. gün) OTA seviyesinde % 24,97 oranında azalma tespit edilirken, yaklaşık 20 ppb OTA ilave edilen örneğin (B) OTA seviyesinde % 18,74 oranında bir azalma olduğu belirlenmiştir. Yaklaşık 30 ppb OTA ilave edilen örnekte (C) ise daha düşük düzeyde bir azalma (% 8,9) olduğu tespit edilmiştir. Fermentasyon boyunca OTA konsantrasyonu arttıkça, OTA'daki parçalanma oranı da azalmıştır.

Fermentasyon boyunca OTA konsantrasyonu maya gelişimini etkilemiş, OTA ihtiva eden örneklerde maya gelişimi daha yavaş olmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda OTA ihtiva eden mayşede tespit edilen maya sayısı; kontrol ve düşük konsantrasyonda OTA ihtiva eden mayşedeki maya sayısına göre düşük bulunmuştur. Fermentasyon boyunca 5. güne kadar maya sayısında bir artış, 8. ve 10. günlerde az oranda bir düşüş meydana gelmiştir. Kontrol ve düşük konsantrasyonlu A örneğinde 0. günde maya sayısı ortalama $2,94 \times 10^5$ kob/g iken 5. günde ortalama $1,25 \times 10^6$ kob/g'a çıkmış ve 10. günde $2,55 \times 10^5$ kob/g'a düşmüştür. Yüksek konsantrasyonlu B ve C örneklerinde 0. günde ortalama 3×10^5 kob/g iken, 5. günde ortalama $5,73 \times 10^5$ kob/g'a çıkmış ve 10. günde $2,38 \times 10^5$ kob/g'a düşmüştür.

Fermentasyon boyunca pH değerinde OTA konsantrasyonu yüksek olan örneklerde, düşük olanlara göre daha yavaş düşüş gözlenmiştir. 0. günde tüm örneklerde pH değeri 4,80 iken 5. günde ortalama olarak kontrol örneğinde 3,81, A örneğinde 3,83, B örneğinde 3,86 ve C örneğinde 3,88'e düşmüştür. 10. günde ise K, A, B ve C örneklerinin ortalama pH değerleri sırasıyla 3.89, 3.93, 3.90 ve 3.91 olarak tespit edilmiştir.

Fermentasyon başlangıcında asitlik tüm örneklerde % 0,27 olup 5. güne kadar bütün örneklerde asitlik artmıştır. 5. günde asitlik ortalama olarak K örneğinde % 0,75, A örneğinde % 0,76, B örneğinde % 0,72 ve C örneğinde % 0,67 olarak tespit edilmiştir. Asitlik değerleri 8. ve 10. günlerde sabit yada çok az seviyede değişmiştir. 10. günde asitlik değerleri ortalama olarak K örneğinde % 0,64, A örneğinde % 0,77, B örneğinde % 0,70 ve C örneğinde % 0,66 olmuştur.

Fermentasyon süresince örneklerde alkol oluşumu farklılık göstermiştir. Örneklerde OTA konsantrasyonu arttıkça oluşan alkol oranı düşmüştür. K örneğinde 10. günün sonunda % 7,5 oranında alkol oluşurken, A örneğinde ortalama % 6,60, B örneğinde ortalama % 6,20 ve C örneğinde % 6,00 oranında alkol oluşmuştur.

Mayşenin Brix değeri fermentasyon başlangıcında 12,00 iken 10. gün sonunda 5,0-5,8'e kadar düşmüştür. Fermentasyon sonunda (10. gün) K örneğinin Brix değerinin ortalama 5,00, A örneğinin Brix değerinin ortalama 5,50, B örneğinin Brix değerinin ortalama 5,25 ve C örneğinin Brix değerinin ortalama 5,80'e kadar düştüğü tespit edilmiştir. Örneklerde OTA konsantrasyonu arttıkça Brix değeri de yüksek bulunmuştur.

Fermentasyon başlangıcında tüm örneklerde toplam şeker oranı % 6,62 iken, fermentasyon sonunda (10. gün) K örneği ortalama % 0,53, A örneği ortalama % 0,77, B örneği ortalama % 0,89 ve C örneği de ortalama % 1,02 oranında tespit edilmiştir. Örneklerde OTA konsantrasyonu arttıkça % şeker miktarı da daha yüksek tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler:

Arpa, Malt, Bira, Okratoksin A (OTA), Fermentasyon, OTA'nın parçalanması

SUMMARY

THE PRESENCE OF OCHRATOXIN A (OTA) IN BARLEY, MALT, BEER and DEGRADATION OF OCHRATOXIN A by YEAST DURING THE BREWING

The presence of Ochrotoxin A (OTA) were investigated in barley, malt and beer samples by using Elisa method. Depending on OTA concentration, changes in OTA content, yeast count, pH, acidity (%) and Brix values, total sugar (%) and alcohol amount (%) were determined during beer fermentation.

Totally 150 beer samples were purchased from Tekirdag province by random sampling. 15 out of 150 samples were collected from imported beers. 30 different barley samples were provided from Bahri Dagdas Internetal Winter Grain Research Center and 25 different malt samples were taken from 3 different company.

In 27 barley samples out of 30, OTA contents were established between 0,22-12 ppb, and mean value was 4.78 ppb. OTA content was determined below 3 ppb in 16.7 % of the barley samples, 3 to 5 ppb in 23.3 % and above 5 ppb in 50 % of the barley samples.

While OTA was not found in only, 1 out of 25 malt samples, it was established between 0.2-6.6 ppb in 24 sample (96 %). In 40 % of OTA detected samples, While the OTA level was determined below 3 ppb, and this figure was ranged between 3 to 5 ppb in 44 % of the samples and above 5 ppb in 16 % of the OTA detected malt samples.

OTA contents have changed between 0,01 to 8.10 ppb in 53 (35.34 %) out of 150 beer samples (135 domestic + 15 imported samples). 97 (64.66 %) beer samples did not contain OTA at detectable level. Only one beer sample contained more than 5 ppb OTA while OTA amount of 9 beer samples including 7 domestic and 2 imported samples ranged between 3 to 5 ppb.

Diffussion method were used in order to determine the affect of OTA on beer yeast. It was concluded that, beer yeast development decreased as the OTA concentration increase.

Changes in OTA levels of wort, which was contaminated with different levels of OTA were determined during fermentation. After from 10 days of fermentation, OTA content of sample A, which includes approximately 10 ppb added OTA, decreased 24.97 % while this figure was 18.74 % in samples B which includes 20 ppb added OTA. In sample C, which includes 30 ppb added OTA, decreasing level (8.9 %) of OTA was less than the other two samples. Degradation of OTA decreased as the OTA concentration increasing during fermentation.

OTA concentration effected yeast growth during fermentation and yeast growth were found low in OTA containing samples according to the others. Yeast count established in wort added OTA at high concentration were found low compared with control group and yeast count in wort contained OTA at low concentration. Yeast count increased until the 5th day during fermentation, and then gradually decreased on 8 th and 10 th days. In control sample and sample A, average yeast count were determined as 2.94×10^5 cfu/g at the beginning of fermentation, and this figure increased to 1.25×10^6 cfu/g on the 5 th day, and decreased to 2.55×10^5 cfu/g on the 10 th day of fermentation.

A slow decreased has been observed in pH value of the samples including high level of OTA compared to low level OTA including samples. pH value of all samples was measured as 4.8 at the onset of fermentation, and this figure dropped to 4.80, 3.81, 3.86 and 3.88 on the 5th day of fermentation in control, A, B, and C samples, respectively. At the 10 th day of fermentation, pH values respectively were measured as 3.89, 3.93, 3.90 and 3.91 in control, A, B, and C samples.

Acidity value of all samples was 0.27 % at the beginning of fermentation. This value increased gradually until the 5th day determined as 0.75 %, 0.76 %, 0.72 %, and 0.67 % on the 5 th day in sample (K (Control), A, B, and C, respectively. On the 8th and 10 th days of fermentation, acidity value of the samples changed slightly. On the 10th day, acidity value of the samples was found as 0.64 %, 0.77 %, 0.70 %, and 0.66 % in sample K, A, B, and C, respectively.

Alcohol formation showed difference among the samples during fermentation. Alcohol concentration of the samples decreased together with OTA concentration increase. On the 10 th day day, alcohol concentration was measured as 7.50 %, 6.60 %, 6.20 %, and 6.00 % in sample K, A, B, and C, respectively.

Brix value of the wort decreased to 5.0-5.8 at the 10 th day while it was 12.00 at the onset of fermentation. At the end of fermentation (10 th day), average Brix values dropped to 5.00, 5.50, 5.25, and 5.80 in sample K, A, B, and C, respectively. Brix value of the samples increased as OTA concentration increase.

At the beginning of fermentation, total sugar ratio of all samples was 6.62 %. At the end of fermentation (10th day) average Brix values were decreased to 5.00, 5.50, 5.25, and 5.80 in sample K, A, B, and C, respectively. Total sugar value of the samples increased as OTA concentration increase.

Key Words:

Barley, Malt, Beer, Ochratoxin A(OTA), Fermentation, OTA degradation.

GİRİŞ

Dünyadaki üretilen tarımsal ürünlerin her yıl yaklaşık % 18'i fungal enfeksiyon nedeniyle bozulmakta ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Coker ve ark., 1984). Mikroorganizmalar içinde yer alan küfler ürünlerde gelişerek, bir yandan ürünün kalitesini değiştirip bozulmasına neden olurken, diğer yandan insan sağlığı için zararlı toksik bileşikler meydana getirirler. Küflerin zararlı etkileri sonucu her yıl ürünlerde dikkate değer kayıplar olmaktadır (Topal, 1985; Akkurt, 1991). Yapılan tahminlere göre dünya genelinde üretilen gıda ve diğer tarımsal ürünlerin küfler tarafından, insan ve hayvanların tüketemeyecekleri düzeyde bozulmaya uğraması sonucu ekonomik kayıplar olmakta ve bu kayıplar dünya genelinde 16 milyar Amerikan Dolarını geçmektedir (Pitt ve Hotcking, 1985; Topal, 1993). Ayrıca ürünlerde sıcaklık, rutubet miktarı, su miktarı vb. nedenlerle uygun depolama şartlarının sağlanmaması durumunda küf mantarları gelişerek ürünün biyolojik özelliklerini, beslenme değerini ve teknolojik kalitesinde önemli zararlara neden olmaktadır (Özkaya ve Kahveci, 1989).

Tarımsal ürünlerin üretiminden tüketimine kadar geçen işlem aşamalarında mikroorganizmalarla kontamine olma riski oldukça fazladır. Bu mikroorganizmalardan özellikle küfler, her ortamda bulunurlar ve tarımsal ürünlere hasattan önce, harman ve depolama sırasında da bulaşmanın olduğu belirlenmiştir (Çoksöyler ve Özkaya, 1987; Roth ve ark., 1990).

Küflerin tarım ürünlerinde meydana getirdiği bozulmaların yanısıra oluşturdukları sekonder metabolitlere "mikotoksin" denir. Mikotoksinler ile kontamine olmuş gıdaları ve yemleri tüketen insan ve hayvanlarda meydana gelen hastalıklara "mikotoksikozis" adı verilmektedir (Davis ve Diener, 1978; Charles ve Hurburgh, 1995; Gürgün ve ark., 1995). Mikotoksinlerin neden oldukları hastalıkların eski zamanlardan beri insan ve hayvan sağlığını etkilediği bilinmektedir. İlk mikotoksikozis vakası 1850'lerde tespit edilmiş olup, *Claviceps purpurea* adındaki küfün oluşturduğu ergot adı

verilen toksinin yol açtığı ergotizm zehirlenmesidir. 1900 yılında İngiltere'de meydana gelen bir olayda da, *Fusarium moniliforme* ile kontamine olmuş mısırla beslenen sığır, at ve kümes hayvanlarında ölümler meydana gelmiş ve buna da “küflü mısır toksikozisi” denilmiştir. Dünyadaki önemli bazı mikotoksikozis vakaları arasında, 1942-1947 yıllarında Sovyetler Birliği'nde binlerce insanın ölümüne neden olan *Fusarium sporotrichioides* toksinlerinin yol açtığı Alimentary Toxic Aleukia (ATA), Balkanlar'da görülen okratoksinlerin neden olduğu Balkan Endemik Nefropatisi ve 1960 yılında İngiltere'de bazı *Aspergillus* türü küflerle kontamine olmuş yer fıstığı ile beslenen yaklaşık 100.000 hindi ve ördek yavrusunun ölüm olayları sayılabilir (Anonymous,1977; Bottalico,1987).

Arpa ve malt küflenmesi en kolay ürünlerdendir. Bira yapımında hammadde olarak kullanılan arpa gerek depolama sırasında, gerekse üretim esnasında (malta) küf kontaminasyonu ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Malt üretim aşamalarında küflerin gelişmesi için uygun rutubet, nem ve zaman bulunmaktadır (Krämer, 1992; Olsen ve ark., 1993).

Bira, alkolün meydana getirdiği tahribat hesaba katılmazsa, besleyici değeri olan bir içecektir. Akdeniz ülkeleri ve Almanya'da oldukça yaygın olarak tüketilmektedir (Krämer, 1992). Bira ve maltın içeriği ve üretim şekli Türk Standartlarında; (TS 4369, Aralık 1984) malt, “biralık malt, arpanın (TS 4078/1, Aralık 1983) tekniğine uygun olarak çimlendirilmesi ve sonra kurutulup kavrulması suretiyle elde olunan ve bira yapımında kullanılan hammaddedir” şeklinde tanımlanmıştır (Anonymous, 1986).

Şişelenmiş ve kutulanmış biralar standardında (TS 2259, Kasım 1986) ”Bira, malt ve diğer ekstrakt verici maddelerin öğütülüp, sıcak su ile belirli metotlara göre işlenmesiyle elde olunan şıranın, şerbetçi otu (*Humulus lupulus*) veya preparatları ile kaynatılması ve soğutulduktan sonra bira mayası ile fermente edilmiş, dinlendirilmiş ve pastörize edilmiş, içinde çözünmüş halde karbondioksit bulunan alkolsüz veya alkollü içecektir” şeklinde tanımlanmıştır. Ekstrakt verici maddelerde “pirinç, mısır, darı, buğday, yulaf, sorgum ile bunlardan yapılmış ürünler ve çeşitli şekerlerdir” şeklinde tanımlanmaktadır (Anonymous, 1986).

Biranın hammaddesi olan arpa ve maltta gelişen küflerin (*Aspergillus* ve *Penicillium*) sekonder metabolitleri olan toksinlerin en önemlilerinden biri okratoksin (OT) olup; insan, hayvan ve bitkiler için toksik olan bir maddedir (Atkins ve Norman, 1998).

Okratoksin ilk olarak, Güney Afrika'lı kimyacılar tarafından laboratuvar çalışmaları sırasında, *Aspergillus ochraceus*'tan izole edilmiş ve bu küften ismini almıştır. Fakat keşfedildiği yıllarda insan ve hayvan hastalıkları ile bir bağlantı kurulamamıştır. Daha sonraki yıllarda böbrek hastalıklarına sebep olduğu anlaşılmıştır (Krogh, 1987). İnsanlarda Balkan Endemik Nefropatisi (BEN), domuzlarda Danimarka Böbrek Nefropatisi ve ayrıca kümes hayvanlarındaki önemli bir problemin muhtemel kaynağı olarak okratoksin A gösterilmektedir (Steyn, 1984). Ayrıca, okratoksin A'nın, Bulgaristan, Romanya, Yugoslavya ve Tuna nehri kıyısı kırsal kesimlerinde görülen nefropatisi (kronik böbrek hastalığı) ile ilişkisi konusunda kuvvetli bulgular bulunmaktadır (Krogh, 1974; Krogh ve ark., 1977; Betina, 1989). Okratoksinler ilk olarak Balkan ülkelerinde kendini göstermiştir (Hult ve ark., 1982; Petkova-Bacharova ve ark., 1988). Sonra Almanya (Bauer ve Gareis, 1987) ve İskandinav ülkelerinde (Breitholtz ve ark., 1991), Fransa, Yunanistan, İtalya, Portekiz ve İspanya gibi Avrupa ülkelerinde problemlere sebep olmuştur. Bu bölgelerde insanların kanlarında okratoksine rastlanıldığı bildirilirken (Krogh, 1987), çeşitli hububatlar, domuz ve kümes hayvanları için kullanılabilir yemler ve bira üretiminde kullanılan malt hububatlarının analiz edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Creppy ve ark., 1991). Çeşitli ülkelerde hububatların okratoksin ile kontaminasyonu olasılığının çok yüksek olduğu belirtilmiştir (Steyn, 1984).

Biranın hammaddesi olan malt birçok tahıldan elde edilmekle beraber genellikle arpadan yapılmaktadır. Malt, bira ve viskinin hammaddesi olması yanında içeriğindeki vitamin ve besin maddeleri nedeniyle ekmek, un, bebek mamalarında katkı maddesi olarak, sporcuların beslenme tablolarından eksik olmayan ve bu sebeplerden dolayı dünyada çok kullanılan önemli bir gıda maddesidir. Ayrıca NATO dahil birçok kuruluş ve ülke askeri amaçlı tablet besin maddesi olarak maltın kullanılabilirliği konusunda çalışmalara devam etmektedir (Anonymous, 2000b).

Biralarda en sık görülen mikotoksin olan okratoksinin işlem aşamalarında bir kısmının parçalandığı, bir kısmının da parçalanmadan kaldığı yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir. Okratoksinin biraya geçme riski göz önünde bulundurularak bu ürünlerde okratoksin analizlerinin yapılması çok önemlidir. Bira tüketiminin arttığı Türkiye’de, ürünlerde bu toksinin bulunması tüketicilerin sağlığı açısından bir risk taşımakla birlikte, ihraç edilen ürünlerin pazar payını da ciddi bir şekilde etkilemektedir. Türkiye’de yıllık arpa üretimi 7 milyon tonlarda olmasına rağmen malt sektörünün ihtiyacı olan 179.000 ton, kalite sorunu nedeniyle karşılanamamaktadır. Yapılan ithalat zorunluluğu nedeniyle Türkiye’den yurt dışına döviz kaybı söz konusu olmaktadır. Türkiye’ye 1998 yılında 1880 hL bira ithalatı olmuştur. Bira sektörünün yıllık üretim miktarı 1998 yılında 6.600.000 hL ve bu üretilen miktarın % 90’ından fazlası iç piyasada tüketilmektedir (Anonymous, 2000b). Bu sebepten dolayı iç piyasadaki biraların okratoksin A (OTA) içeriğinin tespiti yanında ithal edilen biraların da OTA içeriğinin tespiti büyük önem taşımaktadır.

Aflatoksinler ve okratoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkileri tespit edildikten sonra, birçok ülkeler bu mikotoksinler için gıda ve yemlerde maksimum bulunabilecek miktarları belirlemişlerdir. Ancak, belirlenen sınırların altındaki değerler güvenilir anlamına gelmediği için, ülkeler sürekli olarak bulunabilecek miktarları azaltma eğilimindedir (Taydaş, 1993). Birçok Avrupa ülkesinde tarımsal ürünlerde bulunması gereken sınır değerler belirlenirken Türkiye’de böyle bir değerin bulunmaması bu konuda yeni araştırmalar yapılması gerekliliğini göstermektedir. Ülke insanının sağlıklı ürün tüketmesi ve ihraç edilen ürünler sayesinde dünya pazarından önemli bir pay alabilmesi için ürünlerin genel okratoksin içeriğinin bilinmesi gerekmektedir. Türkiye’de okratoksin A (OTA) ile ilgili yapılan tarama çalışmalarının sayısı az olmakla birlikte, yapılan araştırmalarda gıda ve yemlerde göz ardı edilmeyecek kadar yüksek düzeyde okratoksin A (OTA) olduğu bildirilmektedir (Kaya ve ark., 1990).

Günümüzde 300 civarında mikotoksin bilinmektedir. Bu konuda yapılan araştırmaların çoğunluğu aflatoksin ve trikotesenler üzerinde yoğunlaşmış; okratoksin (OT), patulin, sitrinin, sterigmatosistin, zearalenon gibi mikotoksinlerle çalışmalar son zamanlarda artmaya başlamıştır (Goto, 1990). Biralarda okratoksin konusunda dünyada yapılan benzer çalışmalar olmasına rağmen Türkiye’de yapılan benzeri çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Bu araştırmada okratoksin oluşumuna uygun arpa, malt ve bundan yapılan birada okratoksin A (OTA) varlığının belirlenmesi, ürünlerin genel durumunun ortaya konması amaçlanmıştır. Türkiye’deki bira tüketiminin her geçen yıl daha da artması nedeniyle yapılan bu çalışmalar önem kazanmaktadır. Ayrıca çalışmada okratoksinin hammaddeden (arpa, malt) son ürün olan biraya geçiş düzeyi ve üretim aşamalarındaki okratoksin A (OTA)’nın tespitinin yapılması, mayaların okratoksin üzerine etkisinin tespit edilmesi ve okratoksinin mayaların gelişimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

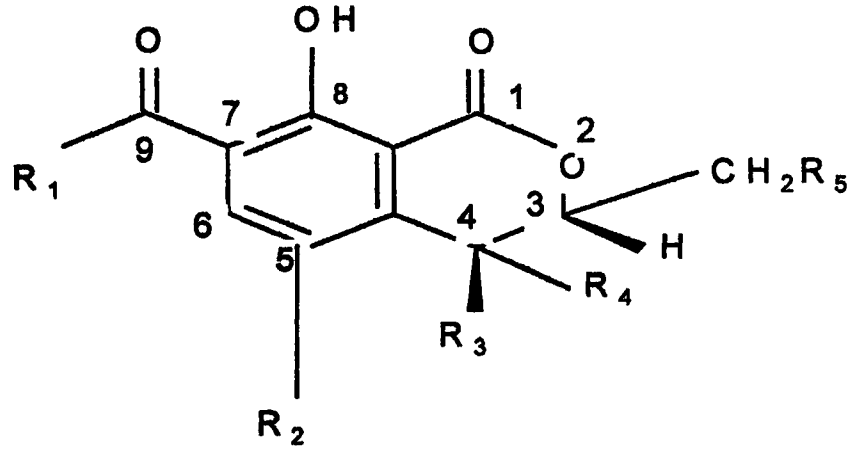
2.1. Okratoksinin Yapısı ve Özellikleri

Okratoksinler *Aspergillus* ve *Penicillium* küfleri tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Okratoksinlerin 10'u aşkın türeği vardır. Teknolojik olarak en önemlileri Okratoksin A (OTA), Okratoksin B (OTB) ve Okratoksin C (OTC)'dir. Bunlardan en toksik olanı ise OTA'dır (Scott ve ark., 1972; Jay, 1992).

Okratoksin suda çözünen renksiz bir bileşiktir. UV ışınları altında okratoksin A (OTA) yeşilimsi, Okratoksin B ve Okratoksin C mavimsi renkte floresan ışık verir. Ayrıca OTA, UV ışınlarında asit solusyonda yeşil iken, alkalide mavi renge dönebilir (Jay, 1992). Normal olarak kristal toz haldedir. Kristallerin erime noktası 169 °C'dir. OTA'nın serbest asitleri polar organik solventlerde çözünür. OTA havada ve ışıktaki stabil değildir. Işıktaki ve nemde parçalanır. OTA'nın ısıya karşı stabil olduğu, yemeklerin normal pişirme sıcaklığında tahrip olmadığı bildirilmiştir. Hububat ürünlerinin 3 saat boyunca otaklavlanması halinde bile OTA'nın % 35'i parçalanmadan kalmaktadır (IARC, 1983). Tamova (1977), Bulgaristan'da Hollanda birası, musluk suyu ve unda okratoksin analizleri yapmış ve haricen ürünlere % 22 oranında OTA ilave etmiş, pastörizasyon ve şişeleme esnasında OTA düzeyinde bir azalmanın olmadığını, unlarda ise 250-300°C'de 40 dakikada okratoksin oranında sadece % 32 oranında bir azalma olduğunu bildirmiştir. İnsanlarda OTA'nın biyolojik olarak yarılanma zamanı bilinmemekle birlikte, maymunlarda 510, insanlarda da 840 saatten fazla olduğu varsayılmaktadır. OTA'nın ticari olarak bir kullanım alanı yoktur, ancak bazı laboratuvar deneylerinde kullanılmaktadır (Hagelberg ve ark., 1989; Anonymous, 2001b).

Okratoksin A; L-β-fenilalanine karboksil grubuyla bağlanmış, 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi-3,4-dihidro-3R-metilizokumarin içermektedir. Soğukta ve karanlıkta muhafaza etmek koşulu ile etanol içinde 1 yıldan daha fazla stabil olan bu bileşik; hububat, gıda, hayvan yemleri ve çeşitli hayvan dokularında sıkça rastlanmaktadır (Mirocha ve ark., 1980; IARC, 1983; Fukal, 1990; Xiao ve ark., 1996).

Okratoksinin kimyasal yapısı ve ilgili metabolitleri Şekil 2.1'de verilmiştir (Anonymous, 1991).



R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	
Fenilalanil	Cl	H	H	H	Okratoksin A
Fenilalanil	H	H	H	H	Okratoksin B
Fenilalanil etil ester	Cl	H	H	H	Okratoksin C
Fenilalanil metil ester	Cl	H	H	H	Okratoksin A metil ester
Fenilalanil metil ester	H	H	H	H	Okratoksin B metil ester
Fenilalanil etil ester	H	H	H	H	Okratoksin B etil ester
OH	Cl	H	H	H	Okratoksin α
OH	H	H	H	H	Okratoksin β
Fenilalanil	Cl	H	OH	H	4R-Hidroksiokratoksin A
Fenilalanil	Cl	OH	H	H	4S-Hidroksiokratoksin A
Fenilalanil	Cl	H	H	OH	10- Hidroksiokratoksin A

Şekil 2.1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı ve ilgili metabolitleri.

Kimyasal yapısında fenilalanin, Cl ve OH içeren dihidroizokumarin bulunur (Betina, 1989). Okratoksin A'nın Cl içermeyen türevi okratoksin B, etilester türevi ise okratoksin C'dir. Bu iki türev gıdalarda görülseler de düşük konsantrasyonlarda bulunduklarından fazlaca önem taşımazlar (Tunail, 2000). Okratoksin A çok sayıda küf tarafından üretilirken okratoksin B (OTB), OTA'dan klor grubunun uzaklaşması ile oluşmaktadır ve OTB ve OTC doğal olarak bulunmamaktadır (Jay, 1992).

2.2. Okratoksin Üreten Küfler ve Gelişme Şartları

Okratoksin oluşturan küfler (*Aspergillus* ve *Penicillium*) ılıman ve soğuk iklim kuşağında arpa, buğday, yulaf, mısır gibi ürünlerde uygun koşullar (rutubet) bulunduğunda anılan ürünlerin depolanmaları süresince kolaylıkla gelişirler (Hald ve Krogh, 1975; Lacey, 1989; Olsen ve ark., 1993; Şener ve Yıldırım, 2000).

Varga ve ark. (1996)'nın bildirdiklerine göre, Okratoksin A'nın, *Aspergillus ochraceus* türlerinin sekonder metaboliti olan bir mikotoksin olduğunu ilk olarak Scott (1965) belirtmiştir. Sonraki yıllarda başka *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin de bu toksini ürettiği ortaya çıkmıştır. Bu türler içine *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. melleus*, *A. petrakii*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. carbonarius*, *Penicillium viridicatum*, *P. cyclopium*, *P. variable*, *P. verrucosum*, *P. palitans* gibi türler girmektedir (Ciegler, 1972; Chelkowski ve ark., 1987; Abarca ve ark., 1994; Bridge ve ark., 1989; Pitt, 1987; Topal, 1993).

Eğer depolama şartları fungal aktiviteyi desteklerse, *Aspergillus* ve *Penicillium* gelişimine sık sık rastlanır. Sıcaklık 20-35 °C olduğu zaman *Aspergillus*'un gelişme şartları için nem içeriği % 14-15 iken (buğday, yulaf, çavdar, arpa), *Penicillium*'lar ise daha yüksek neme ihtiyaç duymaktadır. *P. verrucosum* için nem oranı % 16-17'dir. Bu verilere göre arpanın depolanmasında nem içeriği % 16,3'ün üzeri, buğdayın % 17,3'ün üzeri OTA oluşmasına potansiyel bir risk teşkil etmektedir (Anonymous, 2000a). Yapılan çalışmalarda OTA, *A. ochraceus* ve *P. viridicatum* arpada, 20 °C'de fermentasyonun 21. gününde en çok gelişmektedir (Damaglou ve ark., 1984). Soğuk ortamlarda okratoksin oluşumu için en büyük etken *Penicillium viridicatum* gösterilirken, *Aspergillus ochraceus* sıcak iklime sahip bölgelerde en büyük etken olarak gösterilmektedir (Taydaş, 1993). *A. ochraceus*'un okratoksin üretebilmesi için minimum su aktivitesi 0,83-0,87, *P. cyclopium* için 0,87-0,90 ve *P. viridicatum* için 0,83-0,86'dır. Optimum sıcaklıkta (24 °C) ise gerekli olan su aktivitesi sırasıyla 0,99-0,95 ve 0,99'dur. Küflerin okratoksin üretmesi için gerekli olan optimum sıcaklık ise *A. ochraceus* için 12-37 °C iken diğerleri için de 4-31 °C'dir (Krogh, 1987). Chu (1974) okratoksinin ortalama 30 °C'de ve 0,85-0,95 su aktivitesinde (a_w) ilgili küfler tarafından çok iyi üretildiğini bildirmiştir. Sıcaklık azaldıkça yüksek bağıl neme ihtiyaç duyulmaktadır. *Penicillium* türü küfler diğerlerine nazaran düşük sıcaklıkta toksin

oluşturabilmelerine rağmen (Tunail, 2000), genelde küflerin 10 °C'nin altında ve 0,65 su aktivitesinin altında OTA üretemedikleri bildirilmiştir (Frank, 1991b).

Yapılan çalışmalar okratoksin oluşumuna depolama şartlarının da etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Vesela ve ark. (1978), Çekoslovakya'da okratoksin A'yı *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* ile kontamine olmuş yemlik arpadan izole etmişler ve tanımlamışlardır. Abramson ve ark. (1980), Kanada'da bir çiftlikte % 21 rutubette yığın olarak bulunan arpa, buğday ve yulaf tanelerinde 20 hafta boyunca oluşan toksin miktarlarını incelemişler, 4 hafta sonra arpa ve buğdayda OTA tespit ettiklerini, yulafta ise OTA'ya rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Yine Abramson ve ark. (1999), yaptıkları bir başka çalışmada arpaları bir çiftlikte % 15 ve % 19 nem içeriğinde 20 hafta boyunca depolamışlar, % 19 nem ihtiva eden arpalarda 24 µg/kg OTA, 38 µg/kg citrinin ve 411 µg/kg sterigmatocystin oluştuğunu tespit etmişlerdir. Nemi % 15 olan arpalarda ise herhangi bir toksine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Scudamore ve ark. (1999) İngiltere'de çiftlikte depolanan buğday, arpa ve yulaf örneklerinde 148 buğday örneğinin 22'sinde (%14,9) ortalama 1,94 µg/kg, 131 arpa örneğinin 35'inde (%26,7) ortalama 2,60 µg/kg, ve 21 yulaf örneğinin 6'sında (%28,6) ortalama 0,53 µg/kg OTA tespit etmişlerdir. Araştırmacılar en yüksek OTA konsantrasyonunun arpalarda olduğunu (17,8 µg/kg) bildirmişlerdir. Buğday örneklerinin 2'sinin 30 ve 81 µg/kg OTA içerdiğinden red edildiğini, 7 örneğin (%2,7) 5µg/kg'ı aştığını, 1 örneğin (%0,3) 10 µg/kg olduğunu, 10 örneğin ise (%3,3) 2 ile 5 µg/kg arasında OTA içerdiğini tespit etmişlerdir. Sonuçta OTA konsantrasyonunun; nem, depolama zamanı, coğrafi bölgeler arasında ilişki olduğunu, İngiltere'de depolanan tahılların % 2'sinin 5 µg/kg'ı aştığını ve bu miktarında 500000 tona tekabül ettiğini bildirmektedirler.

Haggbloom (1982), rutubetlendirilmiş arpaya OTA üreten *Aspergillus ochraceus* ($1,4 \times 10^3$ adet/g) ve *Penicillium viridicatum* ($1,4 \times 10^5$ adet/g) inokule etmiş ve 10 ve 25 °C'da 28 gün boyunca OTA üretimlerini izlemiştir. 25 °C'da inokulasyondan 4-6 gün sonra OTA üretimi tespit etmiş, 28 gün sonra maximum seviyede olduğunu ortaya koymuştur. 25 gün sonra 25 °C'da OTA miktarının 7-46 µg/g arasında değiştiğini ve 10 °C'da ise sadece *Penicillium viridicatum*'un toksin üretebildiğini bildirmiştir.

Krogh ve ark. (1984), 1978-1979 Danimarka'nın Bornholm bölgesinde domuzlarda böbrek hastalıklarının ortaya çıkmasından sonra arpa örneklerini mikrobiyolojik olarak incelemişlerdir. 25 °C'da 4 *Aspergillus*, 2 *Penicillium* ve 2 *Mucorales* türü tespit ettiklerini belirtirken, 10 °C'da ise 21 *Penicillium* türü izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Frisvad ve Viuf (1986), depolanmış arpalarda mikotoksin analizleri yapmışlar, arpalarda OTA ile *Penicillium viridicatum* arasında bir ilişki kuramamışlar, 16 örnekten sadece bir tanesinde *Penicillium viridicatum* ve OTA tespit etmişlerdir.

Okratoksin A üreten iki mikroorganizmanın pH 4,5'te hem gelişmesini hem de OTA üretimini inhibe etmek amacıyla 4 farklı kimyasal denenmiştir. Azalan sırayla etkili olanları; potasyum sorbat>sodyum propionat>metil paraben>sodyum bisülfittir. pH 5,5'te en etkili olanlar ise metil paraben ve potasyum sorbat olduğu bildirilmiştir (Jay, 1992).

İngiltere'de 1998-1999 yıllarında depolanmış tahıllarda yapılan tarama çalışmalarında örneklerin % 21'inde ortalama olarak 17,8 µg/kg seviyesinde OTA tespit edilmiş, % 98'inde ise 5 µg/kg'ın altında OTA bulunmuştur (Anonymous, 1999b).

Brewing International Research (BRI) depolanan maltlık arpalarda OTA seviyesinin 0,5 µg/kg'ı geçmemesi gerektiğini, nem oranının % 16'dan düşük olmasını ve iyi kalitede olması gerektiğini tavsiye etmiştir. Buna rağmen rutubetli tahıllar kısa bir zaman için depolanacaksa, depolamadan önce küflerin gelişmemesi için kurutulması gerektiği ve 20 °C'nin altında depolanması gerektiği bildirilmiştir. Eğer ürünlerde *P. verrucosum* canlı ise arpalarda OTA oluşumu beklenebilir (Schwarz ve ark., 1995).

Axberg ve ark.(1997), 6 arpa, 2 ekmeçlik buğday ve 1 durum buğday örneğinde 0,1-0,4 ng/g OTA tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Örnekleri kontrollü oda şartında (0,75-0,85 su aktivitesinde ve 20 °C'de) 8 gün beklettiklerini, *Penicillium verrucosum* inoküle ederek 20 hafta boyunca aynı oda şartlarında inkübasyona bıraktıklarını bildirmişlerdir. Bu zaman içinde OTA içeriğinin arttığını, arpada 0,75 aw'de 34-630 ng/g, 0,85 aw'de 39-26,000 ng/g; buğdayda ise 25 ile 2,300 ng/g ve 650 –5,200 ng/g OTA konsantrasyonu arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Hububatlarda öğütme öncesi temizleme gibi fiziksel uygulamalar sonucunda hububatların OTA konsantrasyonu buğday ununda % 50 düşmektedir. Öğütmenin OTA için bir etkisi olmadığı gibi, bu unlardan da ekmek yapım sırasında sadece birazı parçalanabilmektedir (Anonymous, 1998).

2.3. Okratoksinin Sağlık Üzerine Etkisi

Okratoksin A; nefrotoksik (ürogenital sistem üzerine toksik), immunosupresif (immuno sisteme baskı uygulayıcı), teratojenik (anormal oluşum sebebi), genotoksik (genom üzerine etkili) ve karsinojenik (kanserojen) özelliktedir (Lea ve ark., 1989; Anonymous, 1990a; Henning ve ark., 1991; Xiao ve ark., 1996; Hohler, 1998; Kerkadi ve ark., 1998; Creppy, 1999; Degelmann ve ark., 1999; Anonymous, 2001a). Oral yolla alındığında LD₅₀ değeri farelerde 20-22 mg/kg'dır ve hem karaciğer hem de böbreklere toksik etki yapar (Jay, 1992). Okratoksinlerin hedef organı böbreklerdir ve daha sonra karaciğerde kansere sebep olmaktadır. Etki mekanizması çok karmaşıktır. Organizmanın protein sentezini, mitokondriyal transport sistemini ve glukoneojenazı inhibe ederek kanın pıhtılaşma mekanizmasını bozmaktadır. Ayrıca teratojenik etkinlikte olan OTA, bağışıklık sistemini de baskılayarak sekonder enfeksiyon (*E.coli*) olasılığının artışına neden olabilir. Ayrıca vücutta yağ peroksidasyonunu artırır (Dirheimer ve Creppy, 1991; Marquardt ve Frohlich, 1992; Hohler, 1998). Yapılan çalışmalarda okratoksin A'nın hızlı ve seçici bir protein inhibitörü olduğu, protein ve RNA sentezi üzerinde etkili olmadığı ortaya konmuştur (Taydaş, 1993).

Okratoksinin canlılar üzerine etkisi Çizelge 2.1'de özetlenmiştir (Özkaya ve ark., 1995).

Çizelge 2.1. Okratoksinin canlılar üzerine etkisi

ETKİ ÇEŞİTLERİ	BELİRTİLER
Biyokimyasal etkiler	Hepatik glukojen düzeyinde azalmaya neden olur
Biyolojik etkiler	Deney hayvanlarında tümör oluşumunu artırır
Teratojenite	Protein sentezini inhibe ederler, canlılarda ölü ve sakat doğumlara neden olurlar
Nefrotoksisite	Akut olarak böbreklerde hasar, tümör oluşumu, nefropati ve böbreklerde ani kanama yapar. Böbreklerin proksimal tüplerini etkiler. Şişme, genişleme ve membran kalınlaşmasına neden olur.
Hepatotoksisite	Karaciğer hasarını artırır

OTA'ya maruz kalma sonucunda hastalığın akut bir belirtisi yoktur. İlk belirtileri aşırı yorgunluk, baş ağrısı, kilo kaybı ve solgunluk meydana gelmektedir (Peraica ve ark., 1999). Daha sonraları böbreklerde yaralar ve hastalığın ileri dönemlerinde ise dikkate değer bir şekilde böbreklerde küçülme-ağırlığında azalma ve böbreklerde iltihapsız hücre aralarındaki lifli bağ dokunun artması gibi vakalar meydana gelmektedir (Peraica ve ark., 1999). Birçok ülkede insan kanlarında OTA'ya rastlanması sebebiyle OTA, IARC tarafından kanserojen sınıfına alınmıştır (IARC,1987).

Kuiper-Goodman ve Scott (1989), deneysel hayvanlardan yola çıkarak insanların günlük tolere edebilir OTA miktarını 0,2-4,2 ng/kg vücut ağırlığı olarak belirlemişlerdir. Daha sonra Scott (1993), vücudun, günlük olarak alınan 5-16 ng/kg vücut ağırlığı kadar OTA miktarını tolere edebildiğini bildirmiştir. Avrupa ülkelerinde ise bu oran 1-2 ng/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirtilirken WHO'ya göre 16 ng/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlenmiştir (Hohler, 1998). Zimmerli ve Dick (1996)'e göre, 0,7 ng OTA/kg vücut ağırlığı (erkekler) olarak belirtilirken çocuklarda ise 100 pg OTA/ml den az olması gerektiğini bildirmişlerdir. FAO ve WHO'nun kodeks alimentarius komisyonuna göre ise, 1,2-14 ng OTA/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (Anonymous, 2001a). Kanada'da OTA için 10⁻⁵'te bir risk için günlük tolere edilebilir miktarın 1,2-5,7 ng/kg vücut ağırlığı tavsiye edilmektedir. İskandinav ülkelerinde ise bu oran günlük 5 ng/kg vücut ağırlığı tavsiye edilirken, Norveç'te çocuklar için günlük 5 ng/kg vücut ağırlığı olarak tavsiye edilmiştir (Anonymous, 1998; Skaug, 1999).

OTA'nın, Bulgaristan, Romanya, Yugoslavya ve Tuna nehri kıyısı kırsal kesimlerinde görülen nefropati (kronik böbrek hastalığı) ile ilişkisi konusunda kuvvetli bulgular bulunmaktadır (Betina, 1989; Bach, 1991; Krogh ve ark., 1977; Hohler, 1998). Bu bölgelerde hasta olan insanların gıdalarında ve kanlarında yüksek oranlarda OTA'ya rastlanılmıştır (Pavlovic ve ark., 1979; Petkova-Bacharova ve Castegnaro, 1991b). Yapılan çalışmalarda; Yugoslavya'da 639 insan kanı plazması örneğinin 42'sinde 1-57 ng/ml (Hult ve ark., 1982), Polonya'da 1065 insan kanı plazma örneğinin 77'sinde ortalama 0,27 ve en yüksek 40 ng/ml (Golinski, 1987), Almanya'da 306 kan plazması örneğinin 173 adedinde 0,1-14,4 ng/ml (Bauer ve Gareis, 1987), Danimarka'da 96 örneğin 46 adedinde 0,1-9,2 ng/ml (Hald, 1989), Bulgaristan'da 312 kan plazması örneğinin 45 adedinde ortalama 14 ng/ml OTA tespit edilmiştir (Petkova-Bocharova ve ark., 1988). Emanuelsson ve Hult (1991), İsviçre ve

Yugoslavya'da 294 insan kanı plazmasında OTA analizi yapmışlar, % 46'sında 0,5 ng/ml'den az, % 30'unda 0,5-1 ng/ml, % 24'ünde 1 ng/ml'den fazla OTA konsantrasyonu tespit etmişlerdir. Hald (1991b), Avrupa ülkelerinde insan kanı serum örneklerinin 0,1-14,4 µg/l arasında OTA ile kontamine olduğunu ve yaygın olarak bulunduğunu bildirmiştir. Danimarka'da 3 yıl boyunca kan bankasından tesadüfi kan örnekleri alınmış ve örneklerin % 54,2'si OTA ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Yugoslavya'da 1957-1975 yılları arasında yapılan 14 köyü kapsayan tarama çalışmalarında %0,4-8,3 arasında yıldan yıla artan nefropati tespit edilmiş, bu hastalığın kadınlarda erkeklerden daha çok olduğu belirtilmiştir (Ceovic ve ark., 1991). Bu araştırmanın tersine Kane ve ark. (1991), bildirdiğine göre 1984-1988 yıllarında Senegal'de ölümcül hastaların % 11,47'sinin ürogenital hastalıklı olduğunu, bu hastalığa yakalanan erkeklerin kadınlara oranla 1,9 kat daha fazla olduğunu, ölenlerin çoğunun nefrotitisle ilgili olduğunu belirtmiştir. Senegal'deki nefrotitisin sebebinin doğal olarak gıda ve yerlerdeki OTA olduğunu bildirmiştir. Bulgaristan'da 1950-1954 yılları arasında hastanelerde yatan 664 hastanın 296'sının nefrotitis olduğu bunların 17'sinin hastanede, 103'ünün de evlerinde öldüğü bildirilmiştir (Tanchev ve Dorossiev, 1991).

Fuchs ve ark. (1991), 9 yıl boyunca Balkan nefropatisinin görüldüğü Balkan köylerinde insan kanlarının % 0,5-2,5'inin OTA bakımından pozitif bulunduğunu bildirirken, Creppy ve ark. (1991), Fransa'da kırsal bölgelerde okratoksin pozitif olan hastaların kanlarında ortalama 0,1-6 ng/ml, kentsel bölgelerde ise bu oran 0,1-1,3 ng/ml' olarak bulmuşlardır. Petkova-Bocharova ve Castegnaro (1991a), 1990'da yaptıkları bir çalışmada Bulgaristan'da boşaltım organları tümörlü 20 hastadan 3'ünün kanında (%15) 1-2 ng/g arasında OTA, 2'sinin kanında (%10) 2 ng/g dan çok olmak üzere toplam 5 tanesinde (%25) OTA tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Balkan nefropatisinden etkilenmeyen bölgelerde ise, 30 örnekten 1'inde (%3,3) 1-2 ng/g arası, 1'inde de (%3,3) 2 ng/g'dan çok olmak üzere toplam 2'sinde OTA'ya rastladıklarını bildirmişlerdir. Thuvander ve ark. (2001) İskandinav ülkelerinde kan bağışi yapanların 406 kan plazmasını OTA seviyesi bakımından kontrol ettiklerini Oslo'da OTA seviyesinin 0,18 ng/ml ve Visby'de 0,21 ng/ml olduğunu bildirmişlerdir. Creppy (1999) ise insanların kanlarındaki OTA seviyesindeki değişikliğin, onların sağlık durumu ve ekonomik gelişmesiyle bağlantılı olduğunu bildirmiştir. Az gelişmiş ülkelerin insanların kanlarında OTA daha fazla olduğu araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir.

Gıda ve yemlerde OTA oluşumu, Kanada, Danimarka, Almanya, İsveç, İngiltere gibi ülkelerde çok yaygındır. Almanya, İsveç ve İtalya'da OTA'ya insan sütlerinde bile rastlanılmaktadır (Hohler, 1998; Hald, 1991a). Micco ve ark. (1991) yaptıkları çalışmada 50 insan sütü örneğinin 9'unda 1,7-6,6 ng/ml OTA tespit etmişlerdir. Gareis ve ark. (1988), Almanya'da başka bir çalışmada 36 insan sütü örneğinin 4'ünde 0,017-0,03 ng/ml OTA olduğunu bildirmişlerdir. Skaug (1999) 40 inek sütü örneğinin 6'sında 11-58 ng/l, 47 organik inek sütünün 5'inde 15-28 ng/l OTA tespit etmiştir.

Krogh (1987)'un bildirdiğine göre domuzlarda yapılan bir tarama çalışmasında Danimarka'da 60 böbrekten % 35'inde 2-68 µg/kg, İsviçre'de 129 böbrekten % 25'inde 2-104 µg/kg, yine İsviçre'de 90 böbrekten % 27'sinde 2-88 µg/kg, Macaristan'tan 122 böbrekten % 39'unda 2-100 µg/kg arasında OTA tespit edilmiştir. Tunus böbrek hastalıklarının sebepleri araştırılmış, hastaların gıdaları ve kanlarında yüksek oranda OTA'ya rastlanmıştır (Maaroufi ve ark., 1995a; Maaroufi ve ark., 1995b). Tunus'ta nefropati hastalarının sağlık kontrollerinde gıdalarında 0,3-46830 µg/kg ve kanlarında ise 0,7-1136 ng/ml arasında OTA bulunmuş, kontrollerde nefropati ile gıda ve kanlar arasındaki ilişkinin önemli olduğu bulunmuştur (Anonymous, 1998).

Krogh (1977), Danimarka'da domuzlarda nefropati yaygın olan bir çiftlikten rastgele olarak arpa-yulaf karışımı ve arpalardan örnekler almış ve bunların % 6-8 oranında OTA varlığını tespit etmiştir. Pozitif örneklerin % 47'sinde 200 ppb seviyesinde OTA olduğunu bildirmiştir. Elling (1983), OTA'nın 6 hafta içinde domuzların böbreklerinde lezyon meydana getirdiğini, genç domuzların yaşlılara nazaran OTA'ya daha hassas olduğunu belirtmiştir. Yine Elling'in bildirdiğine göre 1978'de Danimarka'lı bilim adamları arpadan geçen domuz karkaslarında, böbreklerinde OTA'nın kalan kısmının 10 µg/kg'ı aşması durumunda kullanılmaması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu oran 1980'de 25 µg/kg olarak değiştirilmiştir.

2.4.Okratoksinlerin Arpa, Malt ve Birada Bulunuşu

Shotwell ve ark. (1970), ABD'nin farklı bölgelerinde yetiştirilen mısır örneklerinde 83-166 µg/kg düzeyinde OTA tespit ettiklerini, 1971 yılında ise arpa örneklerinde 12-38 µg/kg seviyesinde OTA bulduklarını bildirmişlerdir. Krogh ve ark (1974b), İsviçre'de arpa ve yulaf örneklerinde OTA miktarının 16 ile 410 µg/kg arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Josefsson (1976), İsviçre'de 110 arpa örneğinin 3'ünde 5 µg/kg'ın üzerinde OTA olduğunu bildirirken, Patterson ve ark. (1977), 1973-1975 yılları arasında yaptıkları toksin analizlerinde, depolanmış arpaların OTA içerdiklerini tespit ettiklerini bildirirken, Hokby ve ark. (1979), 269 arpa örneğinin 14 tanesi iz miktarda olmak üzere 17 (%6,3) tanesinde OTA belirlemişler, 3 tanesinde ise 17,20 ve 20 µg/kg seviyesinde OTA olduğunu bildirmişlerdir.

Syrett (1979), çoğunluğunu buğday, arpa, saman, silaj ve karışık yemlerden oluşan 800 örnekte toksin analizi yapmış, 223 tanesinde (% 29) küf tehlikesi olduğundan şüphelenmiş bunların da 43 tanesinde (% 9,6) mikotoksin bulmuştur. 11 adet ithal yem ve 6 adet karışık yem aflatoksin ve arpaların büyük çoğunluğunda okratoksin tespit etmiş, 1977 ve 1978'lerde hayvan hastalıklarının bu yemlerden kaynaklandığı kanısına varmıştır.

Abramson ve ark. (1980), Kanada'da bir çiftlikte % 21 rutubette yağm olarak bulunan arpa, buğday ve yulaf danesinde 20 hafta boyunca toksin miktarlarını incelemişler, 4 hafta sonra arpa ve buğdayda okratoksin tespit ettiklerini, yulafta ise okratoksine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Arpada tespit edilen miktarın buğdayda ancak 20 hafta sonra ortaya çıktığını belirtmişlerdir. *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* türlerini OTA ürettiğini belirtirken diğer ürünlerde ise mikotoksin tespit edememişlerdir.

Chelkowski ve ark. (1981), Polonya'da buğday ve arpaya okratoksin kontamine etmişler, kuru ve ıslak olarak okratoksini ayırmadan değirmenden geçirdikten sonra, kepekte ve iç kısımda okratoksin analizi yapmışlardır. Sonuç olarak iç kısımda sadece % 10-30 arasında okratoksine rastlarken, kepeğe yüksek oranda okratoksinin geçtiğini belirlemişlerdir.

Sokolowski (1983), toplam 811 ezilmiş arpa ve 10 arpa örneğinin OTA varlığı bakımından analiz etmiş, ezilmiş arpada 320 µg/kg, arpada ise 83 µg/kg OTA olduğunu bildirmiştir.

Krogh (1987) bildirdiğine göre yapılan tarama çalışmalarında Danimarka'da 50 malt örneğinin % 6'sında 9-189 µg/kg arasında, Amerika'da 127 arpa örneğinin % 14,2'sinde 10-40 µg/kg arasında, endemik nefropati görülen ülkelerden Yugoslavya'da 64 arpa örneğinin % 12,5'inde 14-27 µg/kg arasında, Rusya'da 48 arpa örneğinin % 2,1'inde ortalama 3800 µg/kg, Polonya'da içinde arpa bulunan 150 adet yemin % 5,3'ünde 50-200 µg/kg arasında, İsviçre'de 84 adet yemlik arpada % 8,3'ünde 16-409 µg/kg arasında, Kanada'da 32 adet yemde % 56,3'ünde 30-27000 µg/kg arasında, Rusya'da 1 adet yemlik arpada (%100) 3800 µg/kg OTA bulunmuştur.

Dietrich (1989), Elisa uygulaması ile gıdalarda mikotoksin taraması yapmış, 1987 ve 1988'de toplam 731 örnekte çeşitli mikotoksinlerin varlığını tespit etmiştir. Bunlardan 177 örneği depolanan hububatlar oluşturmuş, 57'sinde maksimum 2388,7 µg/kg seviyesinde OTA olduğunu tespit etmiştir.

Frank (1991a) Almanya'da 1100 adet tahıl ve tahıl ürününün 113'ünde (%10,3) ortalama 3,8 µg/kg OTA tespit etmiştir. Golinski ve ark. (1991), yaptıkları araştırmalarda 1353 tahıl ürününün % 11,7'si, 1372 yem örneğinin % 1,5'i, 368 ekmeğinin % 17,2'si, 215 un örneğinin % 22,3'ü ve 1065 insan kan serumu örneğinin % 72'sinin okratoksinlerle kontamine olduğunu belirtmişlerdir. 1353 tahıl ürününün 616 adedini arpalar oluşturmuş ve bunların 54'ünde 5-1200 µg/kg arasında OTA tespit ettiklerini ifade etmişlerdir.

Jiao ve ark., (1994) yaptıkları araştırmada 811 adet sebze kaynaklı gıda maddelerinin % 8,3'ünde ortalama 0,5 µg/kg, 456 adet tahıl ve tahıl ürünlerinin % 37,5'inde ortalama 0,77 µg/kg ve 194 bira örneğinin % 41'inde ortalama 0,10 µg/kg OTA konsantrasyonu tespit etmişlerdir. Araştırmacılara göre bu sonuçlar ile tüketicilerin OTA'yı tahıl ve tahıl ürünlerinden % 10 ve biralardan 112 ng OTA/kg vücut ağırlığı/hafta (PTWI) aldığını belirtmişlerdir.

Scott ve Kanhere (1995) yaptıkları bir araştırma sonucunda Kanada'da yerli ve ithal biralardan oluşan toplam 41 bira örneğini OTA bakımından incelemişler ve sonuçta bu örneklerin 26 tanesinde 0,2 µg/ml ve daha az oranda OTA tespit etmişlerdir.

Idler ve ark. (1996), yemlik arpaları, küflenmeye karşı korumak için karanfil, tarçın ve caraway'dan oluşan bir karışım ilave etmişler, bu karışımın % 18 rutubetli arpada küf gelişimi ve OTA oluşumunu engellediğini belirlemişlerdir.

Thellman ve Weber (1997), inceledikleri arpaların % 31'inde 0,1 µg/kg ile 2,7 µg/kg arasında, maltların % 27'sinde 0,1 µg/kg ile 0,92 µg/kg arasında, biralarda ise 0,03 ile 0,08 µg/l arasında OTA tespit etmişlerdir.

Yapılan araştırmalarda, çeşitli hububat ürünleri ve bunlardan yapılan gıda maddeleri, kurutulmuş meyveler, fasulye, kakao, kahve, şarap, yumurta, domuz eti, arpa, malt ve biralarda OTA'nın varlığı ortaya konulmuştur (Creppy, 1999).

Arpa ve diğer tahıl ürünlerinin tarladan başlayarak depolanması ve çimlendirilmesinde mikroorganizmaların etkisinde kaldığı, mikroorganizmaların malt işleme sırasında metabolik aktiviteyi etkilediği, bunun sonucu olarak da malt kalitesi ve bira kalitesinin düştüğü bildirilmiştir. Malt kalitesinin düşmemesi için fiziksel ve kimyasal uygulamalarla, mikrobiyal popülasyonun inaktif hale getirilmesi gerektiği tavsiye edilmektedir (Noots ve ark., 1999).

Gareis (1999), Almanya'da yaptığı bir çalışmada 1996 yılında nemli olarak hasat edilen 89 arpa örneğinde ve 99 adet 5 ay süreyle depolanmış arpa örneğinde OTA ve OTB analizi yapmıştır. Okratoksin bulunan ürünlerde yeni hasat edilenlerde ortalama 0,035 µg/kg OTA ve 0,036 µg/kg OTB, depolanmış arpalarda ortalama 0,1 µg/kg OTA ve 0,04 µg/kg OTB tespit etmiştir. Maltlarda ise 0,26 µg/kg OTA ve 0,04 µg/kg OTB olduğunu bildirmiştir. Sonuç olarak yeni hasat edilen ürünlerle depolanmışlar arasında toksin içeriği bakımından bir farklılık olmadığını beyan etmiştir. Almanya'da yapılan başka bir çalışmada Degelmann ve ark. (1999), 35 adet Alman birasının OTA konsantrasyonunu incelemişler, 9 bira örneğinde 0,1-0,2 µg/L, 21 bira örneğinde iz miktarda (<0,1 µg/L) bulurken ve 5 bira örneğinde ise OTA tespit edememişlerdir.

FAO ve WHO'nun organize ettiği Codex Alimentarius Commission'un verilerine göre Kanada'da yapılan 4 yillik araştırmalarda 58 adet karışık tahıl ürünlerinden 56'sında 0,5-2,0  g/kg arasında, içinde arpa bulunan 20 adet bebek mamasından 18'inde 0,5-0,57 ng/g arasında, yine 20 adet arpa içerikli tahıl ürünlerinden 14 tanesinde 0,2-6,92 ng/g arasında OTA tespit edilmiştir. Aynı komisyonun verilerine göre Norveç'te farklı yıl, mevsim ve yörelerden toplanan toplam 547 tahıl  r neklerinden sadece % 0,9'u 5  g/kg OTA seviyesini aşmıştır.  r neklerin % 2,2'si 3  g/kg seviyesinde bulunmuştur. Avrupa  lkelerinde 1995-1999 yıllarında yapılan tarama çalışmalarında 142 arpa örneğinin % 24'ünde 0,239  g/kg oranında OTA tespiti yapılmıştır. Komisyon düşük nemli yerlerde depolanan  r nlerin OTA içeriklerinin de az olduğunu bildirmiştir (Anonymous, 2001a). İngiltere'de yapılan bir tarama çalışmasında, içinde bira ve şarabın bulunduğu gıda ve tahıl ürünlerinde, 313 örneğin % 75'inde OTA tespit edilememiş, 53  r nkte 4  g/kg'dan az, arpalarından bir tanesinde 6,4  g/kg OTA tespit edilmiştir. OTA bakımından en problemlili  r nekler ise  z mler olmuştur (Anonymous, 1997b).

Nakajima ve ark. (1999), yaptıkları bir araştırmada 22 adet Japon birası, 31 bira üretimi yapan ülkeden toplam 94 adet ithal biralarda OTA analizi yapmışlar ve 94 adet bira örneğinin 86 tanesinde (% 91,5) ortalama 10,1 pg/ml (ppt) ve 22 adet Japon birasının 21 tanesinde (%95,5) ortalama 12,5 pg/ml (ppt) olarak tespit etmişlerdir. Bu biralardan Peru'dan gelen bir bira haricinde hepsinde OTA olduğunu, bu biraların çoğunda OTA'ya rastlanmasına, sıcak iklimde üretilmesinin neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Bresch ve ark. (2000), Almanya'da farklı üreticilere ait toplam 318 adet bira  rneğinde OTA analizi sonucunda % 70-80 oranında 0,01 ile 0,29  g/l düzeyinde OTA tespit etmişlerdir. Biralarda bu oranın içenler için büyük risk teşkil ettiğini, bira yapımında kullanılan arpaların OTA içeriği bakımından incelenmelerinin iyi yapılması gerektiğini bildirmişlerdir. Yine Almanya'da tahıl ve tahıl ürünlerinde yapılan analizler sonucunda 22 adet arpa örneğinin 19 tanesinde tespit edilebilir limitin üzerinde (0,010 ile 0,495  g/kg arasında) OTA belirlenmiştir (Wolf, 2000).

Visconti ve ark. (2000), İtalya'da 10 adet yerli ve 51 adet ithal bira olmak üzere toplam 61 adet bira örneğinde OTA analizi yapmışlar ve sonuçta biralardaki OTA miktarını $>0,01$ ile $0,135$ ng/ml arasında tespit etmişler, biralar arasındaki farklılıkların önemsiz çıktığını bildirmişlerdir.

Filali ve ark. (2001) yaptıkları bir araştırmada 30 adet şarap, 14 adet meyve suyu ve 5 adet bira örneğinde OTA konsantrasyonlarını araştırmışlar ve sonuç olarak şaraplarda ortalama $0,65$ µg/l ($0,028-3,24$ µg/l), 14 adet meyve suyunun 1 adedinde $1,16$ µg/L tespit ettiklerini bildirirken, biralarda OTA'ya rastlamadıklarını beyan etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Soleas ve ark. (2001), toplam 107 adet bira örneği incelemişler analiz sonuçlarında $0,05$ µg/L ile $0,1$ µg/L arasında OTA varlığı tespit etmişlerdir.

Güney Afrika'da üretilen hububat ürünlerinin ve biraların *Apergillus flavus*, *A. alliaceus*, *A.clavatus*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. ile enfekte olduğu rapor edilmiştir. Geleneksel olarak yapılan 29 adet bira örneğinin 13 tanesinde (%45) $3-2340$ µg/l düzeyinde OTA tespit edilmiştir (Odhaw ve Naicker, 2002).

Önceki yapılan araştırmalardan anlaşıldığı gibi yapılan tarama çalışmalarında HPLC'nin yanısıra Elisa yöntemi de tercih edilmiştir. Thirumala-Devi ve ark. (2002), Elisa yöntemi ile okratoksin A'yı $0,1$ ng/ml düzeyinde tespit edebildiklerini ve geri alım miktarlarının da % 90 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca analiz edilen örnek miktarlarının az olduğunu, düşük maliyetli ve uygulamanın basit olduğunu bildirmişlerdir. Elisa yöntemi ile ilgili olarak Pestka (1988) ve Lacey ve ark., (1991), yöntemin antigen-antibody reaksiyonuna dayanan hızlı, spesifik, duyarlı ve ucuz bir analiz metodu olduğunu, sadece tahıllardaki mikotoksinlerin belirlenmesinde değil bütün gıda maddelerindeki mikotoksin içeriklerinin belirlenmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Emanuelsson ve Hult (1991), Elisa yöntemi ile başarılı bir şekilde OTA analizlerinin yapıldığını, geri alım miktarının en az % 65 olduğunu, tespit edilebilir miktarın da $0,1$ ng/ml (ppb) kadar düşük olduğunu bildirmektedirler. Breitholtz ve ark. (1991), 129 örnekte OTA analizini HPLC ve Elisa yöntemi ile yaparak karşılaştırmışlar, Elisa tekniğinin daha hızlı olduğunu, günlük olarak yapılacak mikotoksin analizlerinde pratik olması açısından tavsiye etmişlerdir. Bu çalışmalara ilaveten Weddeling ve ark. (1994) Elisa testi ile (Ridascreen) malt ve biraların OTA ve Zearelenon varlığını incelemişler, analiz sonuçlarının çok duyarlı ve net olduğunu

belirtmişlerdir. Bu çalışmada biralarda OTA konsantrasyonun çok düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Sibanda ve ark. (2001), yaptıkları bir çalışmada farklı ülkelerden topladıkları kahvelerdeki OTA konsantrasyonunu Elisa yöntemi ve HPLC ile ayrı ayrı analiz etmişler ve sonuçta pozitif çıkan örneklerde her iki yöntemde de sonuçların aynı olduğunu bir örnek haricinde önemli bir farklılığın olmadığını tespit etmişlerdir. Krogh (1987), son zamanlarda arpalarda mikotoksin analizi için Elisa yönteminin kullanıldığını, bu yöntemle tespit edilebilir limitin 10 pg/g'a kadar düşebildiğini ve bu metotla çok az numune miktarı ile analiz yapıldığını bildirmiştir.

2.5. Okratoksin A'nın Alkol Fermentasyonundaki Durumu

Gjerten ve ark. (1963), arpa ve diğer hububat ürünlerinin malt ve bira yapımı amacıyla kabul edilmeden önce dikkatli kontrol edilmesi gerektiğini, küflü arpanın bira aromasına ve diğer duyu kalitelerine olumsuz etki ettiğini bildirmişlerdir.

Gjerten ve ark. (1973), Bira yapımında kullanılan hammadde ki (arpa, malt) OTA miktarı son ürün olan biraya % 10 oranında azalarak geçtiğini tespit ederlerken, Chu ve ark (1975) arpadan biraya % 14-28 oranında OTA geçtiğini, işlem aşamalarında OTA'nın % 70'inin parçalandığını ifade etmişlerdir.

Krogh ve ark. (1974a) Citrinin ve OTA ile kontamine edilmiş arpa örneklerinde toksinlerin parçalanma durumunu incelediklerini, yüksek seviyede OTA içeren arpalardan biralara % 2-7 oranında bir geçişin olduğunu, bu sebepten dolayı yüksek seviyede OTA içeren (1000-5000 µg/kg) arpaların bira yapımı için kullanılmaması gerektiğini bildirmişlerdir.

Nip ve ark. (1975) biralardaki işlem aşamalarında OTA'nın durumunu belirlemek için arpalara ezme aşamasında 1-10 µg/g seviyesinde OTA ilave ettiklerini, işlem aşamalarında OTA durumunu incelediklerini ifade etmişlerdir. İşlenmiş arpada % 28-39, mayada % 8-20 ve birada ise %14-18 arasında OTA tespit ettiklerini belirtirlerken, 1 µg/g düzeyinde ilave edilen toksinin %38'inin ve 10 µg/g düzeyinde ilave edilen toksinin ise % 12'sinin bira fermentasyonu sırasında parçalandığını bildirmişlerdir. Bu sonuç, ürün içinde OTA düzeyi yükseldikçe parçalanma seviyesinin azaldığını göstermektedir.

Kostecki ve ark. (1991) mikotoksinlerin detoksifikasyonu için birkaç işlemin yapıldığını, bunlardan birinin alkol fermentasyonu, bira üretimi gibi yöntemler olduğunu bildirmişlerdir.

Scott ve ark. (1995) biraya fermentasyondan önce 0,19 µg/ml OTA, 0,95 µg/ml Fumonisin B₁ (FB₁) ve 0,95 µg/ml Fumonisin B₂ (FB₂) ilave edilerek *Saccharomyces cerevisiae* ile 8 gün süreyle fermentasyona tabi tutmuşlardır. Sonuç olarak birada % 2-13 oranında OTA'da azalma olduğunu FB₁'de % 2-28 ve FB₂'de de % 9-17 oranında azalma meydana geldiğini tespit etmiştir. Yine Scott (1996), biralara fermentasyon öncesi işlem aşamaları içinde, OTA'yı da kapsayan mikotoksinler ilave etmiş, fermentasyondan sonra bu toksinlerin biraya geçebileceğini bildirmiştir. Ayrıca Afrika biralarda aflatoksin ve zearalenon tespit ederken Avrupa biralarda bulamamıştır. Avrupa biralарının sadece 1 tanesinde >1 ng/ml düzeyinde OTA tespit etmiştir. Buna rağmen Kanada ve Avrupa biralарında yüksek oranda Deoxynivalenol bulunduğunu, Alman biralарında bu oranın >200 ng/ml olduğunu, Fumonisinlerin ise limitlerin üzerinde olduğunu bildirmiştir. Scott (1998) başka bir çalışmada gıda ve yemlerde ürün işleme sırasındaki ısı uygulamasının belirli mikotoksinlere belirli oranlarda etki ettiğini, fermentasyonda kullanılan malthalarda da bu yönde bir azalma olabileceğini belirtmiştir.

Baxter ve ark. (2001), yaptıkları bir araştırmada, malta *Penicillium verrucosum* inokule etmişler ve sonuçta maltta 52 µg/kg seviyesinde OTA tespit etmişlerdir. OTA ihtiva eden maltı bira yapımında kullanmışlar ve proteolitik parçalanma sonucu OTA'nın % 40'nın parçalandığını, fermentasyon sonucunda ise OTA seviyesindeki düşüşün % 13-32 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Wolf-Hall ve Schwarz (2002), Bira üretiminde fermentasyonun mikotoksinlerin detoksifikasyonuna etki ettiğini, güvenli bir gıda tüketimi için fermentasyon tekniklerinin geliştirilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

Fermentasyonda OTA'nın yanı sıra şeker oranı, kuru madde, alkol oranı, pH, asitlik (% laktik asit cinsinden), gibi bileşenlerde de belirli değişiklikler meydana gelmektedir. TS 2259'da "Şişelenmiş ve kutulanmış biralар" Türk standartlarında pH 3,8 ile 4,6 arasında olması gerektiği bildirilmiştir. Alkol oranına göre ise % 0,4-2 arasında düşük alkollü, % 2,01-5 arasında normal alkollü ve % 5,01 ile 8,0 arasında ise yüksek alkollü biralар olarak

gruplandırılmıştır. Bira içerisindeki kuru madde oranını da en az 2 g/100g olarak belirtilmiştir (Anonymous, 1986).

Yamauchi ve ark. (1995) yaptıkları bir araştırmada bira fermentasyonunda fazla bulunan her bir derecelik ekstraktın alkol miktarını 1 derece artırdığını tespit etmişlerdir. Krause (1997) Almanya'da yapılan ev tipi biralarda mayşede bulunan % 11'lik ekstraktın % 3'lere kadar indiğini, buna karşılık alkol oranının % 5'lere kadar çıktığını belirtmiştir.

Almeida ve ark. (2001), bira fermentasyonunu etkileyen faktörlerin pH, ilk malt konsantrasyonu ve sıcaklık olduğunu, sıcaklık arttıkça verimliliğinde arttığını, maya sayısının şeker-etanol değişimine etki etmediğini belirtmişlerdir. Trelea ve ark. (2001) ise, fermentasyon sıcaklığı, şerbetçi otu miktarı, ilk maya sayısı, serbest şeker konsantrasyonu, etanol ve CO₂ miktarının bira fermentasyonuna etki ettiğini bildirmişlerdir. King ve Dickinson (2002) mayşedeki şeker miktarını, mayşe konsantrasyonunun % 10'undan daha fazlasının oluşturduğunu belirtirken, Olesen ve ark. (2002), bira fermentasyonu süresince mayşede bulunan karbonhidratların biradaki alkol miktarına etki ettiğini ve mayşedeki karbonhidrat miktarının yaklaşık % 10 olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları araştırmada ise mayşeyi *Saccharomyces carlsbergensis* ile fermentasyona tabi tuttuklarını ve 12 farklı günde gelişmeleri incelediklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ilk 2 gün maya sayısındaki büyük artışa dikkat çekerken, sonra şeker miktarında da bir düşüşün gözlemlendiğini beyan etmişlerdir.

Connor ve ark. (2002) mayşenin bileşimi, mayanın yapısı, fermentasyon sıcaklığı, basınç, hava ile irtibat durumu ve sirkülasyon derecesinin bira fermentasyonunu etkilediğini, fermentasyon süresi boyunca 4,8'den başlayan pH derecesinin belirli bir süre düştüğünü, buna paralel olarak da kuru madde oranında da belirli oranlarda bir düşüş olduğunu belirtmişlerdir.

2.6. Bira Tüketimine Bağlı İntoksikasyonlar

Bira Dünya’da tüketimi oldukça fazla olan fermente alkollü bir içecektir. Ülkelere göre kişi başına bira tüketimi 1998 yılı itibariyle Çizelge 2.2’de verilmiştir. Türkiye’de ise kişi başına bira tüketimi her geçen yıl artmaktadır (Anonymous, 2000b).

Çizelge 2.2. Ülkelere göre kişi başına bira tüketimi (1998 yılı)

ÜLKE	Kişi Başına Bira Tüketimi (litre)	ÜLKE	Kişi Başına Bira Tüketimi (litre)
Almanya	129,0	Slovenya	91,0
Danimarka	113,0	Yeni Zelanda	89,0
Avusturya	113,0	Romanya	40,0
İngiltere	105,0	Rusya	20,0
Avustralya	92,0	Türkiye	10,5

Okratoksinin insanlar üzerine etkisi bilim adamlarınca hala tartışılmakla birlikte Balkan nefropatisi (kronik böbrek hastalığı) ile ilişkisi konusunda kuvvetli bulguların bulunması konu ile ilgili araştırmaları da yoğunlaştırmıştır (Betina, 1989; Krogh ve ark., 1977).

Avrupa’da tespit edilen insan kan serum örneklerinde % 7-76 arasında değişen oranlarda OTA tespit edilmiştir (Tunail, 2000). Endemik nefropati görülen bölgelerde kanda OTA’ya rastlanma sıklığı oldukça yüksektir. Hayvan ve insan OTA pozitif kan örneklerinde toksinin biyolojik yarı değerine inme süresinin oldukça uzun olmasına neden olarak toksinin serum albümini ile bağ oluşturması gösterilmektedir. Thuvander ve ark. (2001) gıda tüketimi ile insanların kan plazması arasında bir ilişkinin literatürlerde yer almadığını ancak hububat ürünleri, şarap, bira, domuz eti gibi birkaç gıda maddesinin tüketimi ile kandaki OTA seviyesi arasında bir ilişki olduğunu bildirmektedirler. Kandaki OTA seviyesi ile en büyük ilişki ise bayanların bira tüketimi ve kepekli ekmek tüketimi sonucu ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Bresch ve ark. (2000) Alman biralılarının %70-80’inin okratoksin içerdiğini bildirmektedirler.

2.7. OTA ile ilgili yasal düzenlemeler

Biranın üretimi ile ilgili yasal düzenlemeler 21 Mart 1956 tarihli Gıda Maddeleri Tüzüğünde yer almaktadır. Bira fabrikalarının kontrolü ve üretilen biraların analizi Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğüne verilmiştir. Sağlık Bakanlığı da yine nizamnameye uygunluk yönünden biranın kontrolünü yapmaktadır. Ayrıca Belediyeler hem fabrikadan, hem de piyasadan aldıkları örnekleri nizamnameye uygunluk yönünden biranın kontrolünü yapmaktadır. Türkiye’de bira için Gıda Kodeksi yönetmeliği henüz hazırlanmamış, fakat çalışmaları sürmektedir. Uygulamalar dış ülkelerde farklılıklar göstermektedir. ABD’de biraya katılan tüm maddelerin FDA tarafından kabulü gerekmektedir. Almanya’da Sağlık Kanunu geçerli olup birada, su, malt, serbetçi otu ve bira mayasından başka bir katkı maddesine izin verilmemektedir (Anonymous, 2000b).

Yapılan tarama çalışmalarda biralarda okratoksin varlığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir. Çeşitli bitkisel ve hayvansal gıdalarda oldukça yaygın olan okratoksinlerin gıda ve yemlerde izin verilen maksimum miktarlarını içeren limitler son yıllarda bir çok ülkenin gıda mevzuatında yer almaya başlamıştır. Dünyada 77 ülkede mikotoksinlerle ilgili çeşitli yönetmelikler mevcut olup, 8’inde bir veya birden fazla üründe OTA ile ilgili standart, 3’ünde ise tavsiye niteliğinde kararlar vardır (Karagözlü ve Karagözlü, 2000). Son zamanlarda ise bu sayı artarak 16’yı bulmuştur. Ülkelerin tavsiye ettiği limit değerler gıdalar için 1-50 µg/kg arasında değişirken, yemlerde bu oran 100-1000 µg/kg arasındadır (Van Egmond, 1991).

FAO ve WHO’nun , Kodeks ve Gıda katkı ve kontaminantları 32. toplantısında tahıl ve tahıl ürünlerinde bulunabilecek en yüksek OTA miktarı 5 µg/kg olarak belirlenmiştir. Komitenin 56. toplantısında riskli sınırm 5 ile 20 µg/kg arasında olduğu, Avrupa ülkelerinde 5 µg/kg geçmemesi gerektiği, ancak toplum sağlığını korumak içinde tahıl ve tahıl ürünlerinde bu sınırın 3 µg/kg’a indirilmesi gerektiği tavsiye edilmiştir (Anonymous, 2001a). Dünyada 1998 yılı itibarı ile 9 ülkede 5 ile 50 µg/kg arasında limit konulurken bugün itibarı ile bu sayı 15’i bulmuştur (Anonymous, 1998).

Bazı ülkelerdeki arpa ve diğer hububatlar, OTA için verilen maksimum tolere edilebilir değerler Çizelge 2.3’de verilmiştir (Van Egmond, 1991; Anonymous, 1997a; Visconti, 2000).

Çizelge 2.3. Bazı ülkelerdeki gıda ve yemlerdeki OTA için verilen maksimum tolere edilebilir değerler.

ÜLKELER	LİMİT DEĞERLER (µg/kg)	Ürünler
Avrupa Birliği	5	Bütün gıdalar
Avusturya	5	Buğday ve çavdar
Brezilya	50	Tahıl ve tahıl ürünleri
Bosna	50	Tahıl ve tahıl ürünleri
Çek Cumhuriyeti	20	Bütün gıdalar
	5	Çocuk mamaları
	1	Bebek mamaları
Danimarka	5	Tahıl ve tahıl ürünleri
Fransa	5	Tahıl ve tahıl ürünleri
Hollanda	3	Tahıl ve tahıl ürünleri
İngiltere	10	Tahıl ve tahıl ürünleri
İsrail	50	Tahıl ve tahıl ürünleri
	300	Yemlik tahıllar
İsveç	200	Kümes hayvanları yemleri
	100	Domuz yemleri
İsviçre	2	Tahıl ve tahıl ürünleri
İtalya	0,5	Bebek mamaları ve kakao
	8	Yeşil kahve
	1	Domuz eti ve ürünleri
	3	Tahıl ve ürünleri
	0,2	Bira
Macaristan	20	Tahıl ve tahıl ürünleri
Romanya	5	Tahıl ve tahıl ürünleri
Türkiye	Yok	Yok
Uruguay	50	Tahıl ve tahıl ürünleri
Yunanistan	20	kahve

Garcis (1999) gıdalarda OTA için maksimum tolere edilebilir miktarın 3-5 µg/kg olması gerektiğini tavsiye etmiştir. Bunun sebebini de OTA'nın birayı da kapsayan ve neredeyse bütün gıdalarda çok yaygın olan mikotoksin olduğu şeklinde belirtmiştir. Avrupa Birliği bu toksin (OTA) için gıdalarda 5 µg/kg'dan düşük olması, (IARC) 4 µg/kg olması gerektiğini, günlük kabul edilebilir oranın 1,5 ng OTA/kg vücut ağırlığı ile sınırlandırılmasını belirtmiştir (Petzinger ve Ziegler, 2000). Dünyada böyle sınır değerlerin belirtilmesine rağmen Türkiye'de herhangi bir sınır değeri yoktur.

Türkiye'de 1997 yılında yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde gıdalarda mikotoksinlerden sadece aflatoksin, patulin ve ergotların miktarına ilişkin değerlere yer verilmiştir (Anonymous, 1997c).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

a. Biranın hammaddesi olan arpa, Bahri Dağdaş Milletlerarası Kışlık Hububat Araştırma Merkezi Müdürlüğünden toplam 30 çeşit olmak üzere tesadüf örnekleme yöntemine göre alınmış, örnekler analiz edilinceye kadar serin ve ışıksız ortamda muhafaza edilmiştir.

b. Malt Türkiye’de üretim yapan iki farklı özel malt fabrikasından ve Tekel Yozgat Bira ve Malt Fabrikasından toplam 25 adet örnek tesadüf örnekleme yöntemine göre temin edilmiştir. Örnekler analizi yapılncaya kadar serin ve ışıksız bir ortamda muhafaza edilmiştir.

c. Bira örneklerini piyasada satılan örnekler oluşturmuştur. Değişik firmalara ait toplam 150 adet bira örneği marketlerden, tesadüf örnekleme yöntemine göre toplanmıştır. Örneklerin 15 adedi ithal biralardan oluşmuştur. Örnekler laboratuvara getirilerek hemen analizleri yapılmıştır.

d. Mayşe Türkiye’de üretim yapan özel bir firmadan temin edilerek, plastik bidona konulmuş ve hemen laboratuvara getirilerek pastörize edilmiştir.

e. Fermentasyonda kullanılan maya, *Saccharomyces carlsbergensis* türü olup bira üretimi yapan iki farklı firmadan temin edilmiştir. Ağzı kapaklı özel şişelerde alınmış, soğuk zinciri bozulmadan hemen laboratuvara getirilerek kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir.

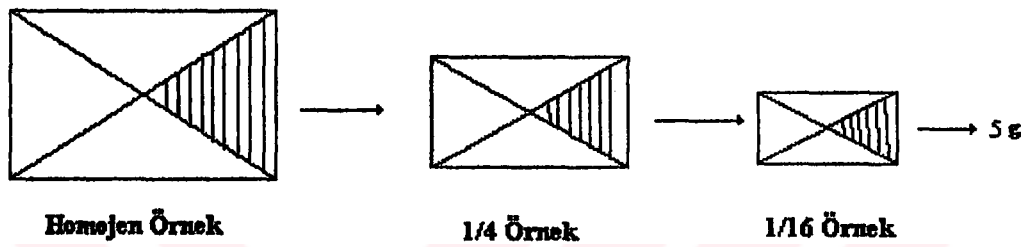
f. Okratoksin A standardı: Ağzı kapaklı küçük cam vialde, etrafı pamukla sarılı ve en dış kısımda ise alimunyum folya ile sarılmış olarak alınmış ve derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Okratoksin A Analizi (Elisa Metodu)

3.2.1.1. Arpa ve Malt Örneklerinin Analize Hazırlanması

Toplanan örnekler el tipi öğütücüde parçalandıktan sonra iyice karıştırılmış ve Şekil 3.1'deki gibi dörde ayırma yöntemine göre toksin analizi için gerekli miktarda örnek alınmıştır (Bullerman, 1978).



Şekil 3.1. Okratoksin A Analizi İçin Örnek Hazırlama Metodu

3.2.1.2. Arpa ve Maltlarda Okratoksin A (OTA) Analizi

Arpa ve malt örnekleri laboratuvarında el tipi değirmende parçalandıktan sonra 5 g örnek bir erlen içine alınmıştır. 12,5 ml %70'lik Methanol (methanol:su) ile 3 dakika çalkalandıktan sonra Whatman 1 filtre kağıdından süzölmüştür. Filtrasyondan 1 ml alınıp 1 ml distile su ile sulandırılmış ve 50 µl alınarak test işlemlerine geçilmiştir (Anonymous, 1999a).

Standartlar önce 0 µg/kg (ppb), 5 µg/kg, 10 µg/kg, 20 µg/kg, 40 µg/kg olarak içerisine OTA antibody bulunan mikrotiter platedeki çukurluklara aktarılmış ve daha sonra ekstraktlardan 50 µl sonraki viallere konulmuştur. Üzerine 50 µl enzim konjuge ve 50 µl okratoksin A antibody konularak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 3 defa saf su ile yıkanmıştır. Üzerine 100 µl substrat/kromogen ilave edilmiş, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 100 µl durdurma solusyonu ilave edildikten sonra 10 dakika içinde "ELx800 Serisi Microplate Reader" da 450 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Sonuçlar bilgisayar ortamında özel program ile otomatik olarak hesaplanmıştır (Anonymous, 1999a).

3.2.1.3. Biralarda Okratoksin A (OTA) Analizi

Bira örneklerinde içindeki CO₂'i uzaklaştırmak için filtre kağıdından 5 ml örnek bir erlen içine alınarak, 12,5 ml %70'lik Methanol (methanol:su) ile 3 dakika çalkalandıktan sonra Whatman 1 filtre kağıdından süzölmüştür. Filtrasyondan 1 ml alınıp 1 ml distile su ile sulandırılmış ve 50 µl alınarak test işlemlerine geçilmiştir. 3.2.1.2'deki arpa ve maltharda okratoksin A (OTA) analizinde uygulanan test işlemleri yapılmıştır (Anonymous, 1999a).

3.2.2. Okratoksin A'nın Maya Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Agar difuzyon metodu ile bira fermentasyonunda kullanılan mayaların (*Saccharomyces carlsbergensis*) çeşitli OTA konsantrasyonlarına hassasiyeti incelenmiştir. Potato Dekstrose Agara maya kültüründen sürme usulü ekim yapıldıktan sonra agar üzerine belirli aralıklarla OTA'nın sudaki çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarında 20 µl damlatılıp, çözeltinin agar difüze olması beklenmiştir. Daha sonra bu petri kutuları 25 °C'de 5 gün süreyle inkübe edilerek, inkübasyon sonucunda OTA damlatılan bölgelerin etrafında şeffaf zon oluşup oluşmadığı (maya gelişip gelişmediği) kontrol edilmiştir. Şeffaf zonlar kumpasla ölçölerek kaydedilmiştir. Şeffaf zonun büyüklüğüne göre mayanın OTA'ya karşı hassas veya dirençli olduklarına karar verilmiştir (Drews, 1974).

3.2.3 Okratoksin A'nın Bira Fermentasyonundaki Durumunun Belirlenmesi

Arpa maltından hazırlanan şerbetçi otuyla kaynatılmış ve pastörize edilmiş 5 litre mayşeye % 2 oranında (100 g) bira mayası (*Saccharomyces carlsbergensis*) ilave edilmiş iyice karıştırılmıştır. Daha sonra steril edilmiş 100 ml'lik kavanozlara dağıtılmıştır. Bu kavanozlardan 6 tanesine içinde yaklaşık 10 µg/kg (A), 6 tanesine yaklaşık 20 µg/kg (B) ve 6 tanesine de yaklaşık 30 µg/kg (C) olacak şekilde OTA ilave edilmiştir. 6 tanesine de kontrol amacıyla OTA ilavesi yapılmamıştır (K). Daha sonra kavanozların ağzı iyice kapatılarak soğutmalı inkübatörde 10 °C'de 10 gün süreyle inkübe edilmiştir. Denemeler 2 paralel olarak yürütölmüştür. Fermentasyonun 0., 1., 3.,

5., 8. ve 10. günlerindeki OTA miktarları ELISA metoduyla tespit edilip, OTA'nın mayalar tarafından parçalanma durumu ortaya konmaya çalışılmıştır (Chu ve ark., 1975; Anonymous, 1999a).

3.2.4. Alkol Miktarının Belirlenmesi

Alkol analizleri Salleron Dujadin marka Ebulyometre ile Tekirdağ Tekel ve Şarap Fabrikasında yapılmıştır. Örnekler önce filtre kağıdından geçirilerek gazı uzaklaştırılmıştır. Metoda göre aletin kazan kısmına 15 ml su konmuş ve termometresi takılarak ocağı yakılmıştır. Su kaynayınca termometre okunmuştur. Sonra aletteki su boşaltılmış, kazan birkaç defa alkol tayini yapılacak örneklerle çalkalandıktan sonra, içine 50 ml örnek konulmuştur. Daha sonra aletin soğutucusuna su konulmuştur. Termometre takılarak kaynama sıcaklığı okunmuştur. Suyun kaynama derecesi sıfıra ayarlandıktan sonra örneğin kaynama sıcaklığına karşılık gelen derece direkt olarak % etil alkol miktarını vermiştir (Anonymous, 1988).

3.2.5. Titrasyon Asitliğinin Belirlenmesi

Fermentasyon sırasındaki titrasyon asitliği TS 2259'a göre % laktik asit cinsinden hesaplanmıştır. Bir erlene 10 ml örnek konulmuştur. Üzerine henüz kaynamış ve soğutulmuş destile sudan rengi açılıncaya kadar konulmuştur. Belirteç olarak birkaç damla % 1'lik fenolftalein çözeltisi damlatılmıştır. 0,1 N NaOH ile titre edilmiştir. Sonuç 1 ml 0,1 NaOH 0,009 g laktik asidi karşılığında sonuç 100 ml'de g olarak laktik asit cinsinden belirlenmiştir (Anonymous, 1986)

3.2.6. pH Değerlerinin Belirlenmesi

Fermentasyon sırasında pH değerleri TS 2259'a göre yapılmıştır. Örnekler 20 °C'de WTW marka 330 model pH metre ile ölçülmüştür (Anonymous, 1986).

3.2.7. Toplam Şeker (%) Oranının Belirlenmesi

Örnekten 10 ml alınarak 200 ml'lik ölçü balonuna konulmuş, bunun üzerine 10 ml Carez I (21,9 g çinko asetat destile suda çözündürülmüş üzerine 3 ml asetik asit eklendikten sonra 100 ml'ye tamamlanmıştır) ve 10 ml Carez II (10,6 g potasyum ferro siyanid destile suda çözündürülüp 100 ml'ye tamamlanmıştır) çözeltileri ilave edilmiştir. Balon çizgisine kadar doldurulup çalkalanmış ve süzölmüştür. Bu süzölmüden 50 ml alınarak 100 ml'lik ölçü balonuna konulmuştur. Üzerine 5 ml HCl (yoğun) balon döndürülerek yavaşça eklenmiştir. Balonun kapağı kapatılarak su banyosunda 65-67 °C'de 5 dakika tutulmuş (inversiyon) ve hızlıca soğutulduktan sonra 5N NaOH ile nötrlenmiştir. Isınmaması için su altında tutulan balon çizgisine tamamlanmış ve bürete doldurulmuştur.

250 ml'lik bir erlene 5 ml Fehling A (34,64g CuSO₄·5H₂O destile suda çözündürülüp ve 500 ml'ye tamamlanmıştır. Süzöldükten sonra renkli şişede saklanmıştır) ve 5 ml Fehling B [173 g Sodyum –Potasyum Tartarat (Senyet tuzu) ve 50 g NaOH birlikte destile suda çözündürülüp 500 ml'ye tamamlanmıştır. İki gün bekletildikten sonra süzölmüştür] konularak erlen asbest üzerine konularak kaynamanın başlaması beklenmiştir. Üzerine metilen mavisi indikatörü damlatılarak renk kiremit kırmızısına dönünceye kadar büretteki çözelti ile titre edilmiştir.

Sonuçta harcanan miktardan toplam şeker miktarı hesaplanmıştır. Hesaplama aşağıdaki gibi yapılmıştır (Anonymous, 1990b).

$$\text{Toplam Şeker (\% g)} = \frac{200 \times 100 \times K}{V \times 50 \times 10} = \frac{K}{V} \times 4000$$

V= Titrasyonda harcanan miktar (ml)

K= Faktör (5 ml Fehling A ve 5 ml Fehling B çözeltilerini indirgeyen mg invert şeker miktarıdır).

3.2.8. Suda Çözünür Kuru Madde İçeriğinin (Briks) Belirlenmesi

Atago Hand Refraktometre (El tipi refraktometre) kullanılmıştır. Örnek homojen halde cam yüzeyi kaplayıncaya kadar konulmuş ve kapağı kapatılmıştır. Etrafı kurulandıktan sonra skaladan 20 °C’da değer okunmuştur (Cemeroğlu, 1992).

3.2.9. Maya Sayısının Belirlenmesi

Maya sayımı için % 10 luk tartarik asit ile pH’sı 3,5’e düşürülmüş “Potato Dextrose Agar (PDA)” kullanılmıştır. Hazırlanan besin ortamı petri kaplarına 10-15 ml kadar dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir. Örnekler 10^{-6} ’ya seyreltilmiş ve bu dilisyonlardan paralel olarak petri kutularındaki PDA üzerine 0,1’er ml ilave edilerek steril drigalski ile yüzeye iyice yayılmıştır. Besin ortamlarının içine iyice nüfuz etmesi için oda sıcaklığında biraz beklenmiş ve ters çevrilerek 25 °C’da 5 gün süreyle inkübe edilerek toplam maya sayısı tespit edilmiştir (Baumgart, 1993).

3.2.10. İstatiksel Analizler

İstatistik analizlerde SPSS paket programı kullanılmıştır. Analiz sonuçları arpa ve malıta istatistiki olarak değerlendirilmiş örnekler arasındaki farkı belirlemek amacıyla tesadüf blokları deneme planında varyans analizi yapılmıştır. Önemli bulunan varyasyon kaynakları, çoklu karşılaştırma testi olan Duncan testine tabi tutulmuştur.

Fermentasyon aşamasında ise 2 faktörlü (Fermentasyon süresi x OTA konsantrasyonu) deneme deseni planında varyans analizleri yapılmıştır. Önemli bulunan varyasyon kaynakları çoklu karşılaştırma testi olan Duncan testine tabi tutulmuştur. Faktörler arasındaki etkileşimi belirlemek için ayrıca korelasyon analizleri de yapılmıştır. İlgili tablolarda farklı harfi taşıyan ortalamaların birbirinden istatistik olarak farklı olduğu ifade edilmiştir. Araştırma iki paralelli ve iki tekerrürlü yapılmıştır (Soysal,1992).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

4.1. Arpa Örneklerinde Okratoksin A (OTA) Miktarı

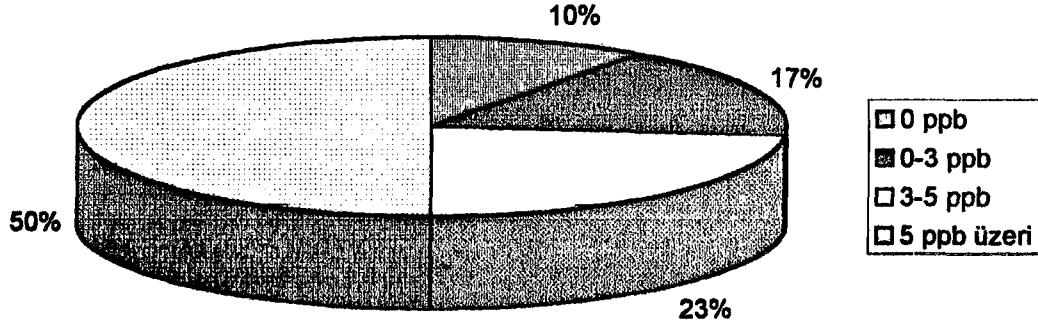
Bu araştırma çerçevesinde 30 adet arpa örneği okratoksin A (OTA) içeriği bakımından incelenmiştir. Buna göre arpa örneklerinin % 10'unda OTA bulunmazken % 90'ında 0,53 ile 12 ppb arasında OTA tespit edilmiştir. Tespit edilen örnekler ve miktarları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Arpa örneklerinde bulunan OTA miktarları (µg/kg, ppb).

Örnek No	OTA miktarı (ppb)	Örnek No	OTA miktarı (ppb)
1	- ^a	16	6,1
2	-	17	5,1
3	-	18	0,22
4	1,9	19	7,2
5	6,1	20	4,4
6	0,53	21	7,1
7	5,7	22	3,8
8	1,1	23	4,2
9	2,6	24	7,2
10	4,2	25	7,3
11	4,2	26	10,5
12	3,8	27	5,4
13	4,6	28	8,1
14	6,9	29	12,0
15	6,8	30	6,2
Minumum			-
Maksimum			12,0
Ortalama			4,78

^a:Tespit edilemedi

Arpa örneklerinin % 10'unda OTA tespit edilmezken, % 16,7'sinde tavsiye edilen değer olan 3 ppb'nin altında OTA bulunmuştur. Buna karşılık % 23,3'ünde 3-5 ppb arasında ve % 50'sinde ise 5 ppb'nin üzerinde OTA tespit edilmiştir. OTA konsantrasyonlarına göre arpa örneklerinin dağılımı Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. OTA konsantrasyonlarına göre arpa örneklerinin dağılımı

Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi arpaların yarısında 5 ppb'nin üzerinde OTA tespit edilmiştir. Tespit edilen değerler Josefsson (1976), Frank (1991a), Jiao ve ark. (1994), Thelman ve Weber (1997)'in buldukları sonuçlar ile benzerlik gösterirken, Sokolowski (1983), Dietrich (1989)'in sonuçlarından düşük, Gareis (1999) ve Wolf (2000)'un bildirdikleri değerlerden yüksek bulunmuştur.

Arpa örneklerinin farklılıklarını belirlemek için varyans analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Arpa örneklerine ait varyans analiz sonuçları.

Varyasyon kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Örnekler	29	809,733	27,922	14213,6*
Hata	60	0,118	0,0002	-
Toplam	89	809,851	-	-

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Varyans analiz sonuçlarına göre örnekler arasındaki farklılıklar $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Önemli bulunan örneklere Duncan testi uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Arpa örneklerine ait Duncan testi sonuçları.

Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
29	12,0	A
26	10,5	B
28	8,1	C
25	7,3	D
24	7,2	E
19	7,2	E
21	7,1	F
14	6,9	G
15	6,8	H
30	6,2	I
5	6,1	J
16	6,1	J
7	5,7	K
27	5,4	L
17	5,1	M
13	4,6	N
20	4,4	O
23	4,2	P
11	4,2	P
10	4,2	P
22	3,8	R
12	3,8	R
9	2,6	S
4	1,9	Ş
8	1,1	T
6	0,53	V
18	0,22	Y
3	0,0	Z
2	0,0	Z
1	0,0	Z

* Aynı harflerle gösterilmiş örnekler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

Arpa örneklerinden 3'ü hariç tüm örneklerde OTA tespit edilmiştir. Örneklerin 22 adedinde tespit edilen OTA miktarı 3 ppb'nin üzerinde çıkmış ve A'dan R'ye kadar olan harfler ile gruplandırılmıştır. Arpa örneklerinden 15 adedi 5 ppb'nin üzerinde yer alırken A ile M grubu arasında yer almıştır. 7 adedi 3 ppb ile 5 ppb arasında OTA seviyesi içerirken N ile R grubu arasında sınıflandırılmıştır. 5 adedinde 3 ppb'den düşük OTA seviyesi nedeniyle Ş ile Y arasında yer alırken, 3., 2. ve 1. örneklerde OTA tespit edilmediği için son gruba girmiştir.

4.2. Malt Örneklerinin Okratoksin A Miktarı

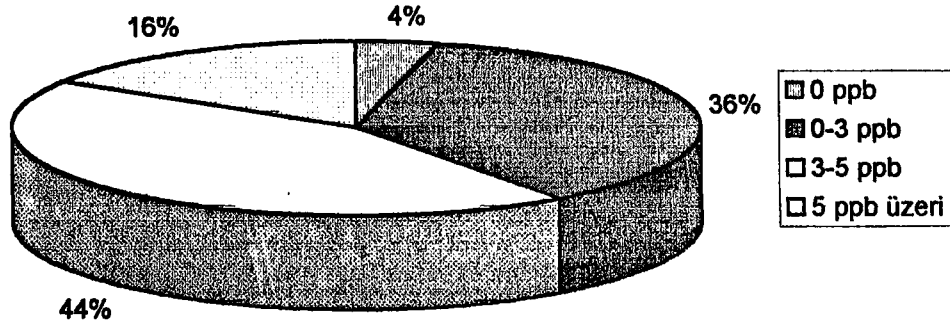
Farklı üreticilere ait 25 adet malt okratoksin A içeriği bakımından incelenmiştir. Buna göre malt örneklerinin % 4'ünde OTA bulunmazken % 96'sında 0,2 ile 6,6 µg/kg arasında OTA tespit edilmiştir. Malt örneklerinde tespit edilen OTA miktarları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Malt örneklerinin OTA miktarları (µg/kg, ppb)

Örnek No	OTA miktarı (ppb)	Örnek No	OTA miktarı (ppb)
1	5,9	14	4,5
2	1,6	15	4,8
3	0,9	16	4,4
4	4,3	17	5,1
5	2,5	18	3,1
6	6,6	19	2,0
7	5,2	20	2,3
8	4,3	21	2,4
9	4,2	22	3,3
10	2,1	23	- ^a
11	4,4	24	4,0
12	4,0	25	0,2
13	0,5		
Minimum			-
Maksimum			6,6
Ortalama			3,3

^a: Tespit edilemedi

OTA tespit edilen örneklerin % 40'ında Avrupa Birliğinin tavsiye ettiği değer olan 3 ppb'nin altında bulunurken, % 44'ünde 3-5 ppb arasında ve % 16'sında ise 5 ppb'nin üzerinde OTA belirlenmiştir. OTA konsantrasyonlarına göre malt örneklerinin dağılımı Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. OTA konsantrasyonlarına göre malt örneklerinin dağılımı.

Tespit edilen değerler Krogh (1987)'un bulduğu değerlerden düşük olarak belirlenmiştir. Malt örneklerindeki OTA miktarı üretim şartlarına ve depolama durumuna göre değişkenlik göstermektedir.

Örnekler arasındaki farklılıkları belirlemek için varyans analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.5' de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Malt örneklerine ait varyans analiz sonuçları.

Varyasyon kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Örnekler	24	232,1	9,671	3858,636*
Hata	50	0,125	0,00250	-
Toplam	74	232,225	-	-

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Varyans analiz sonuçları örnekler arasındaki farklılıklar $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Örnekler arasındaki farklılıkları belirlemek için Duncan testi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Malt örneklerine ait Duncan testi sonuçları.

Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
6	6,6	A
1	5,9	B
7	5,2	C
17	5,1	D
15	4,8	E
14	4,5	F
16	4,4	G
11	4,4	G
8	4,3	H
4	4,3	H
9	4,2	I
24	4,0	J
12	4,0	J
22	3,3	K
18	3,1	L
5	2,5	M
21	2,4	N
20	2,3	O
10	2,1	P
19	2,0	R
2	1,6	S
3	0,9	Ş
13	0,5	T
25	0,14	V
23	0,00	Y

* Aynı harflerle gösterilmiş örnekler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

Malt örnekleri OTA konsantrasyonlarına göre birbirinden farklılık göstermiştir. Toplam 25 adet örneğin 15 adedi 3 ppb'nin üzerinde yer almış ve A ile L harfleri arasında gruplandırılmıştır. Örneklerden 6 nolu örnek ortalama 6,6 ppb OTA seviyesi ile A grubunda yer alırken, 1 nolu örnek B grubunda, 7 nolu örnek C grubunda ve 17 nolu örnek te D grubunda yer almıştır. Örneklerden ilk 4 adedi 5 ppb seviyesini geçmiştir. Duncan testinde farklı gruplar farklı harflerle gösterilmiştir.

4.1. Bira Örneklerinde Okratoksin A Miktarı

Tekirdağ il merkezinde tüketime sunulan 150 adet bira örneği tesadüfî örnekleme yöntemi ile alınmış, Okratoksin A (OTA) analizleri yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.7a, 4.7b ve 4.7c’de verilmiştir. Bira örneklerinin % 64,66’sında OTA tespit edilemezken, % 35,34’ünde OTA bulunmuştur. OTA pozitif çıkan örneklerde en düşük 0,01 µg/l, en yüksek 8,10 µg/l, ortalama 0,449 µg/l seviyesinde OTA tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7a. Bira örneklerinin OTA miktarları (µg/l, ppb)

Örnek No	OTA miktarı (ppb)	Örnek No	OTA miktarı (ppb)
1	- ^a	23	0,05
2	-	24	-
3	-	25	2,90
4	-	26	0,02
5	-	27	1,50
6	-	28	0,03
7	1,00	29	1,20
8	-	30	-
9	1,40	31	-
10*	0,02	32	-
11*	-	33	-
12*	0,01	34	2,90
13	-	35	-
14	0,13	36*	-
15	0,18	37	0,26
16	0,43	38	0,03
17	-	39	0,06
18	-	40	0,04
19	0,51	41	3,70
20	-	42	0,14
21	1,10	43	-
22	0,06	44	1,70

Çizelge 4.7b. Bira örneklerinde bulunan OTA miktarları (µg/l, ppb)

Örnek No	OTA miktarı (ppb)	Örnek No	OTA miktarı (ppb)
45*	0,31	73	-
46*	0,02	74	1,30
47*	0,18	75	-
48*	0,02	76	-
49*	0,40	77	-
50*	0,14	78	-
51	-	79	-
52	-	80	-
53	-	81	-
54	-	82	0,20
55	-	83	0,10
56	4,40	84	4,40
57	-	85	2,50
58	-	86	-
59	-	87	-
60	-	88	4,80
61	-	89	0,40
62	0,41	90	-
63	2,42	91	0,10
64	-	92	-
65	-	93	-
66	-	94	-
67*	-	95	0,10
68*	4,00	96	-
69*	4,20	97	-
70*	-	98	-
71*	-	99	-
72	-	100	-

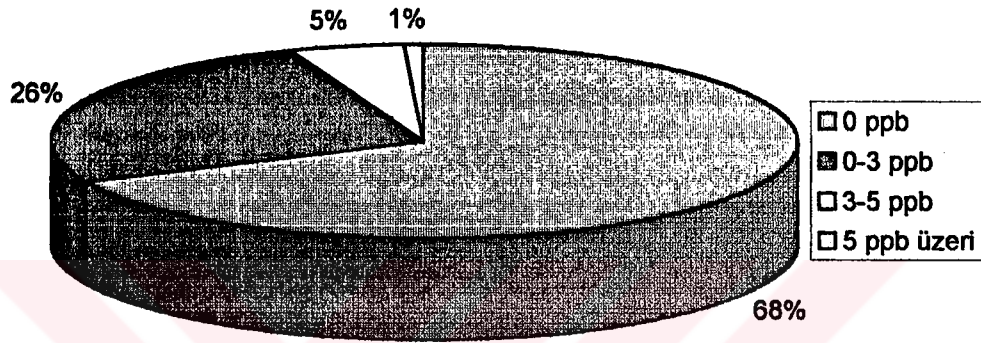
Çizelge 4.7c. Bira örneklerinde bulunan OTA miktarları (µg/kg, ppb)

Örnek No	OTA miktarı (ppb)	Örnek No	OTA miktarı (ppb)
101	-	126	-
102	3,60	127	-
103	-	128	-
104	-	129	-
105	-	130	-
106	-	131	-
107	0,61	132	-
108	-	133	-
109	0,75	134	-
110	-	135	2,90
111	-	136	-
112	-	137	-
113	-	138	-
114	-	139	-
115	-	140	-
116	-	141	-
117	0,51	142	1,10
118	-	143	-
119	-	144	-
120	-	145	-
121	-	146	-
122	-	147	-
123	-	148	-
124	-	149	-
125	8,1	150	-
Minimum			-
Maksimum			8,10
Ortalama			0,449

* Türkiye’de satışı yapılan ithal biralar

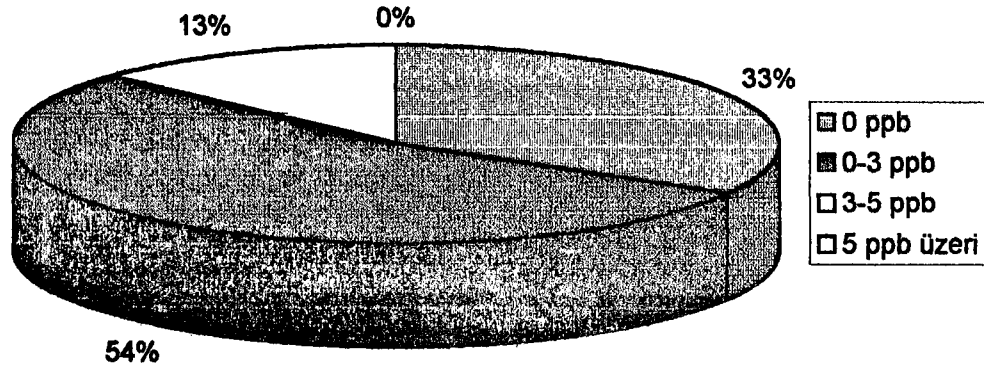
^a: Tespit edilemedi

Toplam 135 adet yerli bira örneğinden 92 adedinde (% 68,15) OTA tespit edilemezken, 35 adet (% 25,92) bira örneğinde 0-3 ppb arasında, 7 adet bira örneğinde (% 5,19) 3-5 ppb arasında ve 1 adet bira örneğinde (%0,74) 5 ppb'nin üzerinde OTA tespit edilmiştir. OTA konsantrasyonlarına göre bira örneklerinin dağılımı Şekil 4.3'de görülmektedir.



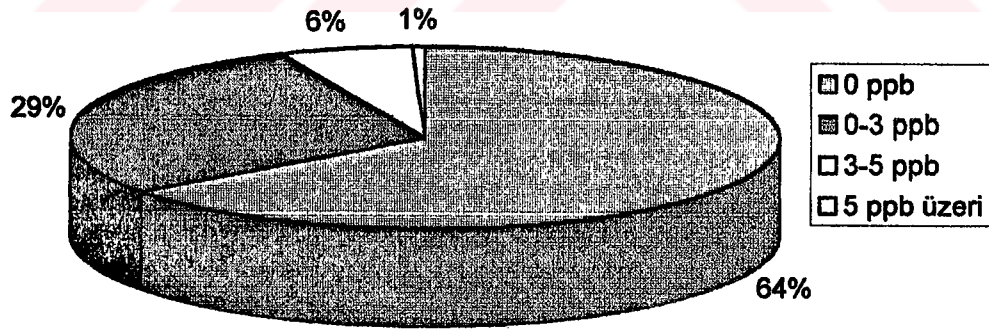
Şekil 4.3. OTA konsantrasyonlarına göre yerli bira örneklerinin dağılımı.

Yerli biraların yanında 15 adet ithal bira örneğinde 0,01 ile 4,20 ppb arasında ve ortalama 0,62 ppb OTA tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda 15 adet bira örneğinin 5 adedinde (% 33,33) OTA tespit edilemezken, 8 adedinde (% 53,33) 0-3 ppb arasında belirlenmiş, 2 adedinde (% 13,33) 3-5 ppb arasında tespit edilmiştir. OTA konsantrasyonlarına göre ithal biraların dağılımı Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. OTA konsantrasyonlarına göre ithal bira örneklerinin dağılımı.

Analizi yapılan toplam 150 adet bira örneğinden 97 adedinde (% 64,66) OTA tespit edilemezken, 43 adedinde (% 28,66) 0-3 ppb arasında, 9 adedinde (% 6) 3-5 ppb ve 1 adedinde ise (% 0,66) 5 ppb 'nin üzerinde OTA tespit edilmiştir. OTA miktarlarına göre bütün bira örneklerinin dağılımı Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. OTA'nın konsantrasyonlarına göre bira örneklerindeki dağılımı

Belirlediğimiz değerler Scott ve Kanhere (1995), Nakajima ve ark. (1999) ve Bresch ve ark. (2000)'nın bulguları ile benzerlik gösterirken, Wisconti ve ark. (2000), Filali ve ark. (2001)'nin buldukları değerlerden yüksek, Odhaw ve Naicker (2002)'in bildirdikleri değerlerden düşük olarak tespit edilmiştir.

Örnekler arasındaki farklılıkların önemli olup olmadıklarını belirlemek için yapılan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Bira örneklerine ait varyans analiz sonuçları.

Varyasyon kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Örnekler	149	632,737	4,247	244994*
Hata	300	0,00520	0,00002	-
Toplam	449	632,742	-	-

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Varyans analiz çizelgesinde örnekler arasındaki farklılıklar $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Önemli bulunan örnekler Duncan testi uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir. Duncan testi sonuçlarına göre; 3 ppb'nin üzerinde OTA ile kontamine bira örnekleri, OTA konsantrasyonlarına göre A'dan G'ye kadar harflerle sınıflandırılmıştır.

125 nolu örnek 8,1 ppb OTA konsantrasyonu ile A grubunda yer alırken, 88 nolu örnek B grubu, 56 ve 84 nolu örnekler C grubunda yer almıştır. A grubu örnek (sadece 125 nolu örnek) 5 ppb seviyeyi aşarken, 7 adet bira örneğindeki OTA miktarı 3 ppb'nin üzerinde tespit edilmiş ve B ile G grubu arasında sıralanmıştır. Örneklerden 51 adedinde OTA belirlenmiş ve bu örnekler gruplandırma yapılmıştır. 99 adet örnekte ise OTA tespit edilemediğinden örnekler aynı grupta yer almıştır.

Çizelge 4.9. Bira örneklerine ait Duncan testi sonuçları.

Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar*	Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar	Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar
125	8,10	A	12	0,01	£	93	0	-
88	4,80	B	1	0	-	94	0	-
56	4,40	C	2	0	-	96	0	-
84	4,40	C	3	0	-	97	0	-
69	4,20	D	4	0	-	98	0	-
68	4,00	E	5	0	-	99	0	-
41	3,70	F	6	0	-	100	0	-
102	3,60	G	8	0	-	101	0	-
25	2,90	H	11	0	-	103	0	-
34	2,90	H	13	0	-	104	0	-
135	2,90	H	17	0	-	105	0	-
85	2,50	I	18	0	-	106	0	-
63	2,42	J	20	0	-	108	0	-
44	1,70	K	24	0	-	110	0	-
27	1,50	L	30	0	-	111	0	-
9	1,40	M	31	0	-	112	0	-
74	1,30	N	32	0	-	113	0	-
29	1,20	O	33	0	-	114	0	-
21	1,10	P	35	0	-	115	0	-
142	1,10	P	36	0	-	116	0	-
7	1,00	Q	43	0	-	118	0	-
109	0,75	R	51	0	-	119	0	-
107	0,61	S	52	0	-	120	0	-
19	0,51	T	53	0	-	121	0	-
117	0,51	T	54	0	-	122	0	-
16	0,43	U	55	0	-	123	0	-
62	0,41	V	57	0	-	124	0	-
49	0,40	W	58	0	-	126	0	-
89	0,40	W	59	0	-	127	0	-
45	0,31	X	60	0	-	128	0	-
37	0,26	Y	61	0	-	129	0	-
82	0,20	Z	64	0	-	130	0	-
15	0,18	[	65	0	-	131	0	-
47	0,18	[	66	0	-	132	0	-
42	0,14	/	67	0	-	133	0	-
50	0,14	/	70	0	-	134	0	-
14	0,13	]	71	0	-	136	0	-
83	0,10	^	72	0	-	137	0	-
91	0,10	^	73	0	-	138	0	-
95	0,10	^	75	0	-	139	0	-
22	0,06	*	76	0	-	140	0	-
39	0,06	*	77	0	-	141	0	-
23	0,05	**	78	0	-	143	0	-
40	0,04	***	79	0	-	144	0	-
28	0,03	****	80	0	-	145	0	-
38	0,03	****	81	0	-	146	0	-
10	0,02	©	86	0	-	147	0	-
26	0,02	©	87	0	-	148	0	-
46	0,02	©	90	0	-	149	0	-
48	0,02	©	92	0	-	150	0	-

* : Aynı harflerle ifade edilen örnekler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

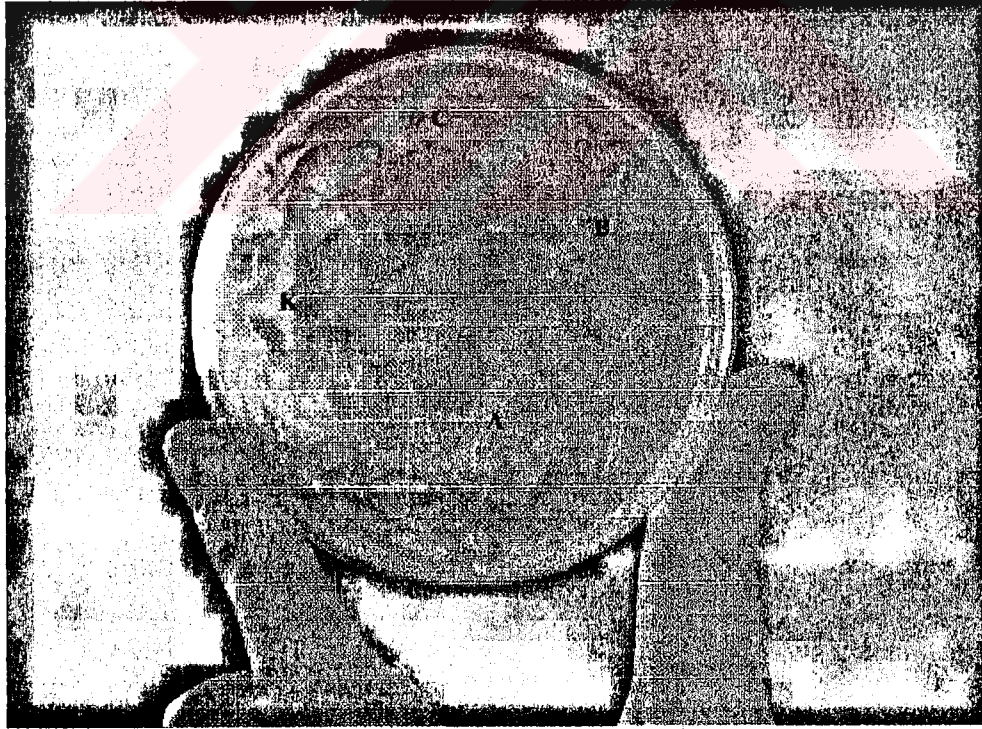
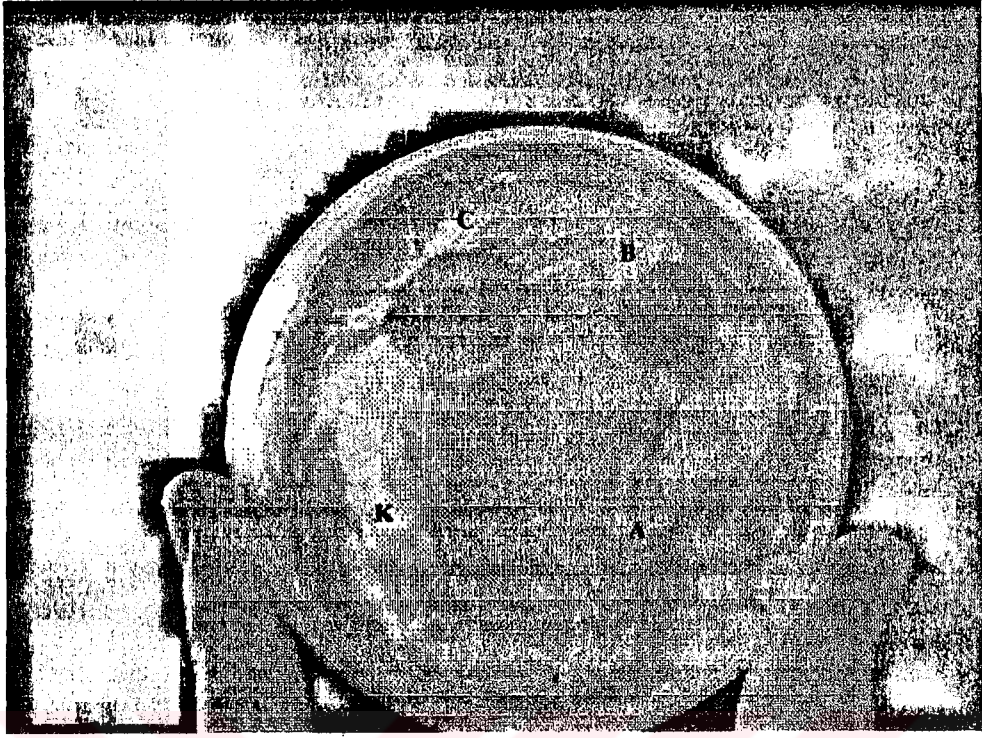
4.4. Okratoksin A'nın Bira Mayası Üzerine Etkisi

Bira fermentasyonunda kullanılan *Saccharomyces carlsbergensis* mayasının OTA konsantrasyonlarına hassasiyeti agar difüzyon metodu kullanılarak incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki OTA, mayaların gelişimini farklı oranlarda etkilemiştir. Patato Dekstrose Agara (PDA) sürme usulü ekilen maya üzerine OTA ihtiva etmeyen saf sudan 20 µl (K), konsantrasyonu 0,05 µg/ml (ppm) olan OTA çözeltisinden 20 µl (Çözelti A), konsantrasyonu 6,81 µg/ml olan OTA çözeltisinden 20 µl (Çözelti B) ve konsantrasyonu 13,61 µg/ml olan OTA çözeltisinden 20 µl (Çözelti C) damlatılmış ve 25 °C'da inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda OTA çözeltisi damlatılan bölgelerin etrafında şeffaf zon olup olmadığı kontrol edilmiş, gelişmenin olmadığı zonlar kumpasla ölçülerek kaydedilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Agar difüzyon yönteminde OTA konsantrasyonuna göre oluşan zon çapları (mm).

Tekerrür/ Standartlar	K(Kontrol) (mm)	Çözelti A (mm)	Çözelti B (mm)	Çözelti C (mm)
1	0	0	14,2	20,0
2	0	0	15,0	22,0
3	0	0	15,0	21,5
Minimum	0	0	14,2	20,0
Maksimum	0	0	15,0	22,0
Ortalama	0	0	14,7	21,2

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi OTA konsantrasyonu arttıkça oluşan zonların çapı da büyümüştür. Konsantrasyonu 0,05 ppm olan OTA çözeltisinin PDA üzerindeki maya gelişimini inhibe etmediği görülmüş, buna karşılık 6,51 ppm ve 13,61 ppm olan OTA çözeltileri konsantrasyonla doğru orantılı olarak maya gelişimini inhibe etmiştir (Çizelge 4.10). Yüksek konsantrasyondaki OTA çözeltilerinin maya gelişimine etkisi Resim 4.1'de verilmiştir.



Resim 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki OTA'nın mayalar üzerine etkisi

Resim 4.1'den de görüldüğü gibi OTA konsantrasyonu arttıkça oluşan zonların çaplarında da büyüme meydana gelmiştir. Zon çapları arasındaki farklılıkları belirlemek için varyans analizi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Zon çapları arasındaki farklılıklara ilişkin varyans analiz sonuçları.

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	0,01	0,01	2,26
Zon çapı	3	10,29	3,43	1391,56*
Hata	6	0,01	0,00	
Genel	11	10,31	-	

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucuna göre tekerrürler arasındaki farklılıklar önemsiz bulunurken, agar difüzyon yönteminde, değişik OTA konsantrasyonlarına göre oluşan zonlar arasındaki farklılıklar $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. OTA seviyelerine göre zon çapları arasındaki farklılık düzeyinin belirlenmesi için Duncan testi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. OTA miktarlarına göre standartların zon çaplarının Duncan testi sonuçları ($p < 0,05$).

Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
Çözelti C	21,2	A
Çözelti B	14,7	B
Kontrol	0,00	C
Çözelti A	0,00	C

* Aynı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

Çizelge 4.12'ye göre kontrol grubu ile çözelti A aynı grupta yer almıştır (C). En yüksek zonlu çözelti C oluşturmuş ve A grubunda yer almıştır. Çözelti B ise daha küçük zon oluşturarak B grubunda yer almıştır.

Düşük konsantrasyondaki OTA çözeltisi mayanın gelişimine pek etki etmemekte, buna karşılık, OTA konsantrasyonu arttıkça maya gelişimi yavaşlamaktadır. Bölüm 4.6'da da benzer bir sonuç ortaya çıkmıştır. Fermentasyon denemelerinde de benzer sonuçlar alınmıştır (Bölüm 4.6). OTA konsantrasyonu 0 ppb olan kontrol grubu ile konsantrasyonu yaklaşık 10 ppb olan A grubu örnek Duncan testinde aynı grupta yer alırken, konsantrasyonu yaklaşık 20 ppb ve 30 ppb olan örnekler (B ve C) farklı gruplarda yer almıştır. Yani düşük oranda OTA konsantrasyonu içeren örnek ile kontrol grubu arasında istatistiki açıdan bir fark bulunmamıştır. Agar difüzyon yönteminde ise OTA konsantrasyonu düşük olan Çözelti A'da hiç bir zon oluşmazken, OTA seviyesine bağlı olarak çözelti B'de ortalama 14,7 mm ve çözelti C'de ortalama 21,2 mm bir zon oluşmuştur.



4.5. Bira Fermentasyonunun OTA'ya Etkisi

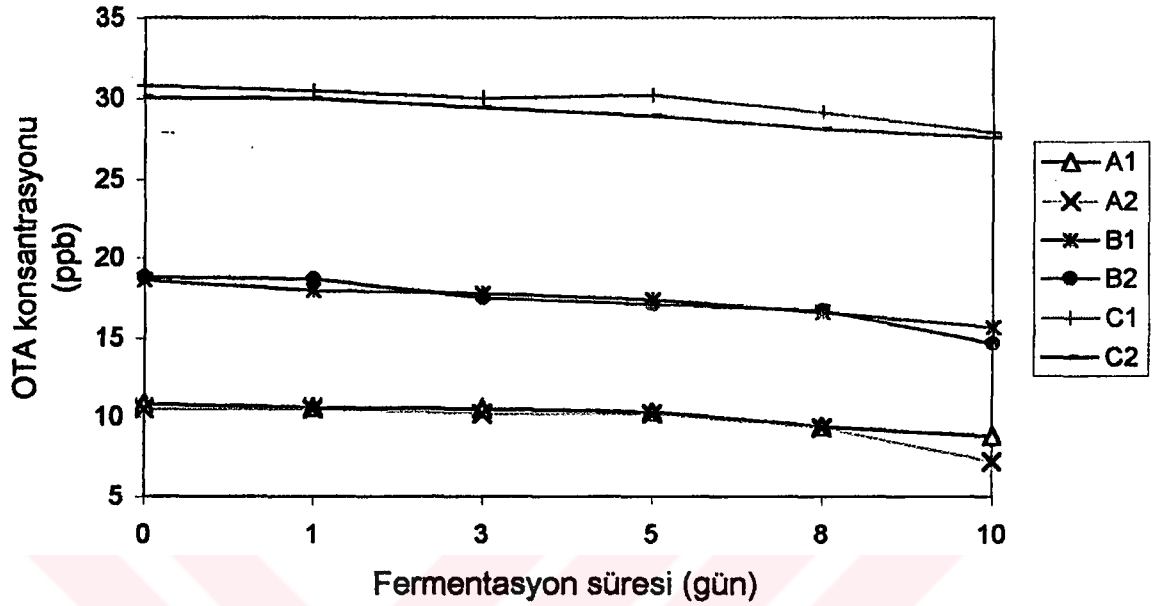
Bira üreticisi firmalardan hazır olarak temin edilen mayşeye % 2 oranında (100 g) bira mayası (*Saccharomyces carlsbergensis*) inoküle edilmiş, 100 ml'lik kavanozlara dağıtılmıştır. Bu kavanozlardan 6 tanesine içinde yaklaşık 10 µg/kg (A), 6 tanesine yaklaşık 20 µg/kg (B) ve 6 tanesine de yaklaşık 30 µg/kg (C) olacak şekilde OTA ilave edilmiş, 6 tanesine de kontrol amacıyla OTA ilavesi yapılmamıştır (K). Daha sonra kavanozların ağzı iyice kapatılarak soğutmalı inkübatörde 10 °C'da 10 gün süreyle inkübe edilmiştir. Fermentasyon süresince örneklerin OTA konsantrasyonlarında belirli oranlarda azalma meydana gelmiştir. Tespit edilen OTA seviyeleri Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Fermentasyon süresinin sonunda (10. gün), içerisinde yaklaşık 10 ppb OTA ile kontamine edilen mayşede (A) OTA miktarında ortalama % 24,97 oranında bir azalma olurken, yaklaşık 20 ppb OTA ile kontamine örneklerde (B) ortalama % 18,74 ve yaklaşık 30 ppb OTA ile kontamine örnekde (C) ortalama % 8,9 oranında bir azalma meydana gelmiştir. Azalma oranları 8. ve 10. günlerde artmıştır. Çizelge 4.14'de de görüldüğü gibi örneklerde OTA miktarı arttıkça fermentasyon sonunda parçalanma oranı azalmıştır. Tespit edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalardan Gjertsen ve ark. (1973), Nip ve ark. (1975), Scott ve ark. (1995) ve Baxter ve ark. (2001) ile benzerlik gösterirken, Krogh ve ark. (1974a) ve Chu ve ark. (1975)'nin yaptıkları çalışmalardan daha fazla oranda OTA'nın fermentasyon sonunda kaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. Bira fermentasyonu süresince OTA'nın durumu (µg/kg).

Örnek	Tekerrür	Fermentasyon Süresi (gün)					
		0	1	3	5	8	10
K	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
A	1	10,8	10,6	10,5	10,3	9,4	8,8
	2	10,5	10,5	10,2	10,2	9,3	7,2
B	1	18,6	18,0	17,8	17,4	16,6	15,7
	2	18,8	18,7	17,5	17,1	16,7	14,7
C	1	30,8	30,5	30,0	30,2	29,1	27,9
	2	30,1	30,0	29,4	28,9	28,1	27,6

Fermentasyon süresince örneklerin OTA seviyelerindeki azalma Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Fermentasyon süresince OTA miktarında meydana gelen değişiklikler.

Şekil 4.6'dan da anlaşıldığı gibi OTA miktarlarındaki azalma A ve B örneklerinde 8. fermentasyon gününden sonra daha da artmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki örnek gruplarında fermentasyon süresince OTA seviyelerindeki farklılıkları belirlemek için varyans analiz yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Fermentasyon süresince Ochratoxin A'daki değişime ilişkin varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	1,18	0,589	9,02
Fermentasyon (A)	5	40,59	8,118	124,35*
OTA Konsant. (B)	3	8291,30	2763,765	42334,44*
Ferm.x OTA (AxB)	15	15,084	1,006	15,40*
Hata	46	3,00	0,065	-
Genel	71	-	-	-

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucuna göre tekerrürler arasındaki farklılıklar önemsiz bulunurken, fermentasyon süresince örneklerin ihtiva ettiği OTA seviyelerindeki değişiklikler ve örnekler (K, A, B, C) arasındaki farklılıklar $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. OTA seviyelerine göre örnekler arasındaki farklılıkların düzeyinin belirlenmesi için Duncan testi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Fermentasyon süresince Okratoksin A miktarlarına göre örnekler arasındaki Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar
C	29,38	A
B	17,30	B
A	9,86	C
K	0,00	D

Örnekler farklı oranda OTA içerdiklerinden farklı gruplarda yer almışlardır ve birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklılık göstermektedir. Örneklerdeki bu farklılıklar fermentasyon süresi boyunca OTA seviyesindeki azalmaların oranının kontrolü bakımından önem taşımaktadır. Her bir örneğin fermentasyon sürelerindeki birbirinden farklılıkları Çizelge 4.16’da Duncan testinde verilmiştir.

Çizelge 4.16. Örneklerin OTA miktarlarına göre fermentasyon sürelerinin Duncan testi sonuçları ($p<0,05$)

Fermentasyon süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
0	14,95	A
1	14,79	A
3	14,43	B
5	14,26	B
8	13,65	C
10	12,74	D

*Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

Örneklerin fermentasyon süresi boyunca OTA konsantrasyonuna göre 0 ve 1. günlerde OTA seviyesinde fazla bir değişiklik olmadığından aynı gruba girmiştir (A). 3. ve 5. günlerde OTA seviyelerinde bir azalma meydana gelmiş ve B grubunda yer almıştır. 8. gün C grubunda yer alırken 10. gün ise en düşük OTA konsantrasyonu nedeniyle D grubunda yer almıştır. Bu gruplar $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklılık göstermiştir. 0. ve 1. günlerde OTA seviyelerindeki azalma fazla olmazken, 3. günde OTA seviyesindeki azalma farklılık göstermiş ve 5. günle aynı gruba girmiştir. OTA seviyelerinde en fazla azalma oranı 8. ve 10. günlerde meydana gelmiştir. Bu da fermentasyonun son günlerinde OTA miktarında önemli derecede azalma olduğunu ortaya koymaktadır.

Fermentasyon süresi ve OTA konsantrasyonunun (örnek) interaksyonu da farklılık göstermiştir. Fermentasyon süresi x OTA konsantrasyonu interaksyonunun (örnekler) Duncan testi de Çizelge 4.17'de verilmiştir. Çizelgeye göre fermentasyon süresi boyunca K örneğinde herhangi bir değişiklik olmadığından bütün fermentasyon günlerinde L grubunda yer almıştır. A örneği 0., 1., 3. ve 5. günlerde fazla bir değişiklik olmadığından I grubunda, 8. ve 10. günlerde OTA konsantrasyonunda değişiklik meydana geldiğinden J ve K grubunda yer almıştır. B örneğinde 0., 1., günlerindeki değişiklik önemsiz bulunurken 3. ve 5. günler arasındaki farklılıklar da önemsiz bulunmuştur. 8. ve 10. günlerdeki farklılık ise önemli bulunmuştur. C örneğinde 0. ve 1. günlerdeki farklılıklar ile 3. ve 5. günlerdeki farklılıklar önemsiz bulunurken, 8. ve 10. günlerde önemli bulunmuştur. Dolayısıyla bütün örneklerde OTA konsantrasyonu fermentasyonun 8. ve 10. günlerinde azalma göstermiştir.

OTA konsantrasyonunun diğer değişkenlerle etkileşimini belirlemek için korelasyon testi uygulanmıştır. Korelasyon Ek 2 çizelge 1'de verilmiştir. OTA konsantrasyonu ile asitlik arasında (CK:-162), alkol arasında (CK:-147), maya sayısı arasında (CK:-150) ters yönlü bir ilişki tespit edilirken, şeker ile (CK:117), pH ile (CK:106), su içerisinde çözünür kurumadde ile (CK:120) doğru orantılı önemsiz düzeyde bir ilişki bulunmuştur. OTA seviyesi arttıkça asitlik miktarı, maya sayısı ve alkol oranında azalma meydana gelirken, şeker oranı, pH değerinde ve Brix değerinde önemsiz düzeyde bir artış meydana gelmiştir.

Çizelge 4.17. Örneklerin OTA konsantrasyonlarına göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Örnekler	Ferm.süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
K	0	0,00	L
	1	0,00	L
	3	0,00	L
	5	0,00	L
	8	0,00	L
	10	0,00	L
A	0	10,65	I
	1	10,55	I
	3	10,35	I
	5	10,25	I
	8	9,35	J
	10	8,00	K
B	0	18,71	E
	1	18,35	E
	3	17,65	F
	5	17,25	F
	8	16,65	G
	10	15,20	H
C	0	30,45	A
	1	30,25	A
	3	29,70	B
	5	29,55	B
	8	28,60	C
	10	27,75	D

* Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

4.6. Fermentasyon Süresince Maya sayısında Meydana Gelen Değişiklikler

Fermentasyon boyunca maya sayılarında 5. güne kadar bir artış, 8. ve 10. günlerde az oranda da olsa bir düşüş meydana gelmiştir. K örneği 0. günde ortalama $2,90 \times 10^5$ cfu/g iken, 5. günde ortalama $1,05 \times 10^6$ cfu/g'a kadar yükselmiş ve 10. günde ortalama $2,02 \times 10^5$ cfu/g'a gerilemiştir. A örneğinde fermentasyonun 0. gününde ortalama $2,97 \times 10^5$ cfu/g ile başlarken 5. günde ortalama 10^6 cfu/g'a çıkmış, 10. günde ortalama $3,07 \times 10^5$ cfu/g'a gerilemiştir. B örneğinde fermentasyonun 0. gününde maya sayısı ortalama $3,05 \times 10^5$ cfu/g iken, 5. günde ortalama $5,25 \times 10^5$ cfu/g'a çıkmış, 10. günde ortalama $2,67 \times 10^5$ cfu/g'a kadar gerilemiştir. C örneğinde fermentasyonun 0. gününde ortalama $2,95 \times 10^5$ cfu/g iken, 5. günde ortalama $6,20 \times 10^5$ cfu/g'a çıkmış ve 10. günde ortalama $2,08 \times 10^5$ cfu/g'a kadar düştüğü tespit edilmiştir.

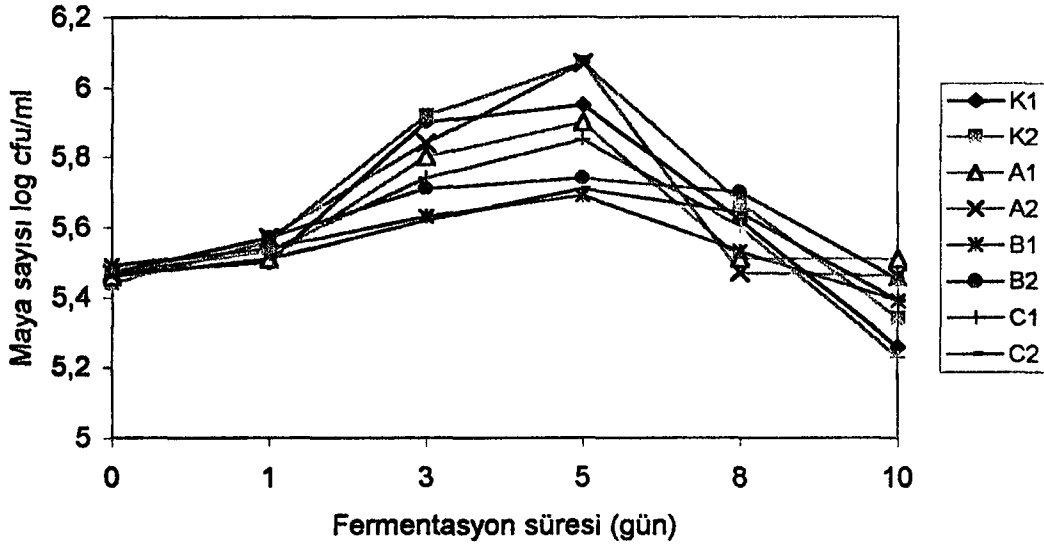
Fermentasyon süresince örneklerin maya sayılarında meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Fermentasyon süresince maya sayısındaki meydana gelen değişiklikler (cfu/g).

Örnek	Tekerrür	Fermentasyon Süresi (Gün)					
		0	1	3	5	8	10
K	1	$3,0 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	$1,85 \times 10^5$
	2	$2,8 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$4,75 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$
A	1	$2,95 \times 10^5$	$3,25 \times 10^5$	$6,42 \times 10^5$	8×10^5	$3,3 \times 10^5$	$3,25 \times 10^5$
	2	$3,0 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$
B	1	$3,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
	2	$3,0 \times 10^5$	$3,75 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$	$2,85 \times 10^5$
C	1	$3,0 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$7,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$
	2	$2,9 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$4,25 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$2,47 \times 10^5$

Tespit edilen maya sayısındaki gelişme King ve Dickinson (2002)'un yapmış oldukları çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Fermentasyon süresince maya sayılarındaki değişiklikler Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Fermentasyon süresince maya sayılarındaki meydana gelen değişiklikler.

Şekil 4.7'den de görüldüğü gibi 0. ve 1. günlerde maya sayılarında fazla bir değişiklik olmazken, 3. ve 5. günlerde maya sayılarında bir artış meydana gelmiştir. 8. ve 10. günlerde ise çok az oranda bir düşüş olmuştur. Fermentasyon süresince C örneği haricinde örnekler arasındaki maya sayıları arasında bir paralellik bulunurken, içerisinde OTA konsantrasyonu fazla olan C örneğindeki maya gelişimi diğer örneklerle nazaran daha az olarak tespit edilmiştir. 3. günde kontrol örneklerindeki maya sayıları diğerlerine nazaran daha fazla gelişmiş, örneklerin konsantrasyon sayıları arttıkça maya sayılarında gelişme oranı azalmıştır. Fermentasyon süresince maya sayılarındaki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Fermentasyon süresince maya sayısındaki değişime ilişkin varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	0,01	0,007	4,12
Fermentasyon (A)	5	2,08	0,416	263,83*
OTA Konsant. (B)	3	0,08	0,028	17,75*
Ferm.x OTA (AxB)	15	0,35	0,023	14,72*
Hata	46	0,07	0,002	-
Genel	71		-	

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

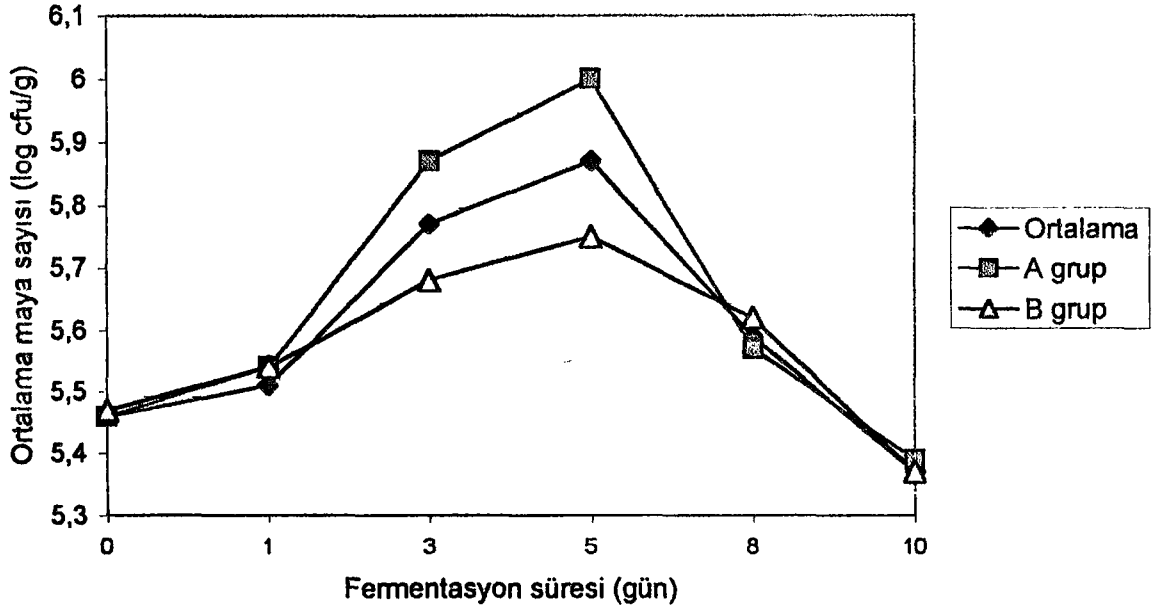
Yapılan varyans analizi sonucuna göre tekerrürler arasındaki farklılıklar önemsiz bulunurken, fermentasyon süresince maya sayılarındaki değişiklikler ve OTA konsantrasyonuna göre gruplar (K, A, B, C) arasındaki farklılıklar $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Ayrıca OTA gruplar arası ve fermentasyon süresi (Fermentasyon x OTA konsantrasyonu) arasındaki interaksiyon da $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. OTA seviyesine göre örnekler arasındaki farklılıkların düzeyinin belirlenmesi için Duncan testi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.20’de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Fermentasyon süresince örnekler arasındaki maya sayılarına göre duncan testi sonuçları.

Örnekler	Maya sayısı (cfu/ml) (Ortalama Değerler)	Sonuçlar*
K	5,64	A
A	5,63	A
B	5,58	B
C	5,56	B

*Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

En yüksek maya sayısı kontrol örneği olan K’da tespit edilirken bunu sırasıyla A, B ve C takip etmektedir. Yapılan Duncan testine göre kontrol örneği (K) ve içerisinde yaklaşık 10 ppb OTA olan A örneği aynı gruba girerken, içerisinde yaklaşık 20 ve 30 ppb olan B ve C örnekleri de diğer gruba girmektedir. Maya sayısı bakımından K, A ve B, C birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklılık göstermektedir. Çizelgeden OTA konsantrasyonunun mayanın gelişimine etki ettiği sonucu çıkarılabilir. Yani yüksek konsantrasyonlarda OTA ihtiva eden mayşede tespit edilen maya sayısının kontrol ve düşük konsantrasyonda OTA ihtiva eden mayşedeki maya sayısına göre düşük bulunmuştur. Yüksek orandaki OTA miktarı maya gelişimini etkilemiştir. Örneklerin maya sayılarına göre yapılan Duncan testinde (Çizelge 4.20) sonuçlar kısmındaki, A grubu örnekler ile B grubu örneklerin maya sayılarının ortalamasının genel ortalamadan sapma miktarları Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. Duncan testine göre A grubu örnekler ile B grubu örneklerin maya sayılarının ortalamasının genel ortalamadan sapma miktarları.

Şekil 4.8'den de anlaşıldığı gibi fermentasyonun 3. ve 5. günlerinde Duncan testine göre A grubunda yer alanlarda genel ortalamasının üzerinde maya gelişimi meydana gelmiş, B grubunda yer alanlarda ise tam tersine genel ortalamasının altında maya gelişimi tespit edilmiştir. Fermentasyonun 8. ve 10. günlerinde ise her iki grupta da maya sayısı genel ortalamaya yakın seyretmiştir. Her iki grup arasındaki fark ortaya çıkmış, B grubunda maya sayısı A grubuna göre gelişmeden düşüşe geçmiştir. Buradan da 20 ve 30 ppb OTA konsantrasyonu ihtiva eden örneklerin maya sayıları genel ortalamasının altında bir gelişme gösterirken, 0 ve 10 ppb OTA konsantrasyonu ihtiva eden örneklerde genel ortalamasının üstünde maya gelişimi olduğu sonucu çıkarılabilir. OTA konsantrasyonu bir örnekte yüksek düzeyde olduğundan, maya gelişimini belirli bir oranda etkilemekte, düşük düzeyli olanlarda fazla bir etkileme söz konusu olmamaktadır. Örneklerin maya sayıları fermentasyon süresi boyunca birbirinden farklılık göstermiştir. Her bir örneğin maya sayılarına göre fermentasyon süresince birbirinden farklılıkları Çizelge 4.21'de Duncan testinde verilmiştir.

Çizelge 4.21. Örneklerin fermentasyon süresince OTA miktarlarına göre Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Fermentasyon süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar
5	5,87	A
3	5,77	B
8	5,59	C
1	5,54	D
0	5,47	E
10	5,38	F

Örneklerin fermentasyon süresi boyunca maya sayıları 5. günde en yüksek iken, 10. gün sonunda en düşük seviyede tespit edilmiştir. Örneklerin maya sayıları fermentasyon süresinin 5. gününe kadar yükselme gösterirken, 5. günden sonra düşüş gözlenmiştir. Maya sayısındaki gelişme 0. ve 1. günlerde az, 5. güne kadar hızlı bir gelişme gösterirken 8. günden sonra bir düşüş ile birlikte 10. gün sonunda en az sayıda maya sayısı tespit edilmiştir. Fermentasyon süresi bakımından bütün günler birbirinden farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Farklı olan bütün gruplar farklı harflerle gösterilmiştir.

Fermentasyon süresi ve OTA konsantrasyonunun (örnek) interaksyonu da birbirinden farklılık göstermiştir. Örneklerin maya sayılarına göre fermentasyon süresi x gruplar arasında yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.22’de verilmiştir.

Fermentasyon süresi boyunca K örneği 5. günde en yüksek maya sayısına ulaşmış ve A grubunda yer almıştır. A örneğinin 5. günü ile K örneğinin 3. günü aynı grupta yer alırken (AB), A örneğinin 3. günü ile C örneğinin 5. günü ve B örneğinin 5. günü aynı grupta yer almıştır (CDE). Tüm örneklerin kendi arasında maya sayısı bakımından en yüksek olduğu gün 5. gün olmuştur. Ancak örnekler birbiri ile farklılık gösterdiğinden maya sayısı da birbirinden farklı bulunmuştur. Örneklerdeki OTA miktarı artışı ile fermentasyondaki maya sayısında bir azalma olmuştur. OTA miktarı fazla olan örneklerde maya gelişimi daha yavaş olduğu tespit edilmiştir. B ve C örneklerinin maya sayılarında, kontrol grubu örneklerinin maya sayıları seviyesine gelmeden azalmalar görülmüş, dolayısıyla fermentasyon tam olarak gerçekleşmemiştir. (Çizelge 4.22).

Maya sayılarının diğ er değişkenlerle etkileşimi belirlemek için korelasyon testi uygulanmıştır. (Ek 2;  izelge 1). Maya sayısı ile pH arasında (CK:-385) ters yönlü bir ilişki tespit edilirken, asitlikle (CK:323), doğru orantılı ve $p<0,01$ düzeyinde önemli bir ilişki bulunmuştur. Maya sayısının artması ile, pH değeri önemli derecede düşerken, tabii olarak asitlik önemli düzeyde artmıştır. Ayrıca maya sayısı ile şeker oranı arasında (CK:-135), su içerisinde     n r kurumadde arasında (CK: -124), OTA konsantrasyonu ile (CK:-150) ters orandaki ilişki ve alkol ile (CK:143) doğru orantılı ilişki önemsiz bulunmuştur. Maya sayısının artması ile, su içerisinde     n r kurumadde, OTA konsantrasyonu ve şeker oranında düşüş gözlenmiştir. Yine maya sayısının artması ile alkol miktarında bir artış gözlenmiş ve bu düzeydeki değişiklikler $p<0,01$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Bu değerlendirmeye ilaveten maya sayısının artması ile pH değerinde düşüş ve asitlikte de artış gözlenmiş ve bu ilişkinin $p<0,01$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.22. Örneklerin maya sayılarına göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Örnekler	Ferm.süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
K	0	5,46	JK
	1	5,53	IJ
	3	5,91	B
	5	6,01	A
	8	5,65	EF
	10	5,30	L
A	0	5,47	JK
	1	5,54	HIJ
	3	5,82	C
	5	5,98	AB
	8	5,49	IJK
	10	5,49	IJK
B	0	5,48	IJK
	1	5,56	GHI
	3	5,67	EF
	5	5,72	DE
	8	5,61	FGH
	10	5,42	K
C	0	5,47	JK
	1	5,52	IJ
	3	5,68	EF
	5	5,78	CD
	8	5,62	FG
	10	5,31	L

* Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

4.7. Fermentasyon Süresince pH Değerinde Meydana Gelen Değişiklikler

Fermentasyon süresince pH değerinde düşme meydana gelmiştir. Fermentasyon başlangıcında (0. gün) tüm örneklerde pH değeri 4,80 olarak tespit edilmiştir. Fermentasyonun 5. gününde K örneği ortalama olarak 3,80, A örneği 3,83, B örneği, 3,86 ve C örneği 3,88 pH değerine düşmüş, 8. ve 10. günlerde bu değerlerde fazla bir değişiklik olmamıştır.

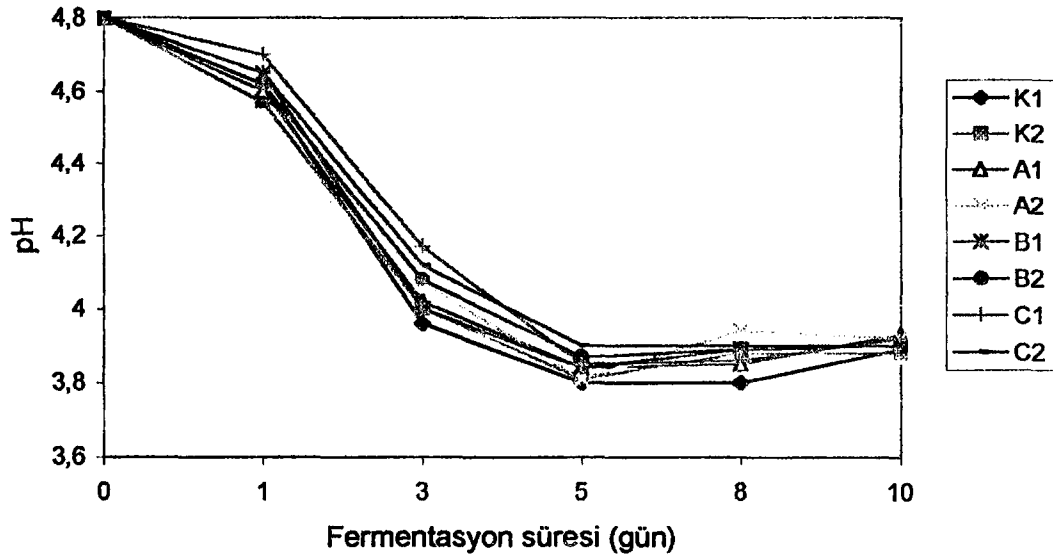
Fermentasyon süresince örneklerin pH değerlerindeki meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.23’de verilmiştir.

Çizelge 4.23. Fermentasyon süresince pH değerinde meydana gelen değişiklikler

Örnek	Tekerrür	Fermentasyon Süresi (Gün)					
		0	1	3	5	8	10
K	1	4,80	4,62	3,96	3,80	3,80	3,89
	2	4,80	4,57	4,00	3,81	3,88	3,88
A	1	4,80	4,60	4,02	3,84	3,85	3,93
	2	4,80	4,62	4,07	3,81	3,94	3,92
B	1	4,80	4,65	4,00	3,84	3,89	3,90
	2	4,80	4,62	4,08	3,87	3,89	3,90
C	1	4,80	4,70	4,17	3,85	3,86	3,92
	2	4,80	4,65	4,12	3,90	3,90	3,90

Tespit edilen pH değerleri TS 2259 “şişelenmiş ve kutulanmış biralar” standardına ve Connor ve ark. (2002)’nin yapmış oldukları çalışma ile uygunluk göstermektedir.

Fermentasyon süresince pH değerlerindeki meydana gelen değişiklik Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. Fermentasyon süresince pH değerinde meydana gelen değişiklikler.

Fermentasyon başında mayşenin pH'sı 4,80 iken, 1. günde örneklerin pH'sında çok az bir değişiklik meydana gelmiştir. 3. ve 5. günlerde çok hızlı bir düşüş görülürken, C1 örneğinde diğer örneklerle nazaran daha az ve yavaş bir düşüş meydana gelmiştir. Fermentasyon süresince pH'daki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.24. Fermentasyon süresince pH'daki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	0,0000	0,001	1,47
Fermentasyon (A)	5	10,61	2,123	92,31*
OTA Konsant. (B)	3	0,04	0,012	29,01*
Ferm.x OTA (AxB)	15	0,03	0,002	5,58*
Hata	46	0,02	0,000	-
Genel	71	-	-	-

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucunda tekerrürler arasındaki farklılıklar önemsiz çıkarken, fermentasyon süreleri ve OTA konsantrasyonlarına göre oluşan örnekler (K, A, B, C) arasındaki farklılıklar ve fermentasyon süresi x OTA konsantrasyonuna göre interaksiyon $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Örnekler arasındaki farklılıkları belirlemek için Duncan testi uygulanmıştır. Fermentasyon süresince örnekler arasındaki pH değerlerine göre Duncan testi sonuçları Çizelge 4.25’de verilmiştir.

Çizelge 4.25. Fermentasyon süresince pH değerlerine göre örnekler arasındaki Duncan testi sonuçları.

Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar
C	4,22	A
B	4,19	B
A	4,18	C
K	4,15	D

Çizelge 4.26’dan da görüldüğü gibi pH değeri en yüksek C örneği olmuştur. Örneklerde OTA konsantrasyonu arttıkça pH değerindeki düşüş yavaşlamıştır. pH değerindeki yavaşlama fermentasyon süresinin uzamasına sebep olabileceği ihtimalini artırmaktadır. Bunun en önemli belirtisi, içerisinde hiç OTA bulundurmeyen kontrol grubu K örneğinde pH değerinde en fazla seviyede düşüş gözlenmiştir. pH değerlerine göre bütün gruplar $p<0,05$ düzeyinde farklı bulunmuştur. Fermentasyon süresi boyunca pH değerlerinde de bir farklılık gözlenmiş ve bu farklılıkları tespit etmek için yapılan Duncan testi ve sonuçları Çizelge 4.26’da verilmiştir.

Çizelge 4.26. Örneklerin pH değerlerine göre fermentasyon süresince Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Fermentasyon süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar
0	4,80	A
1	4,63	B
3	4,05	C
10	3,91	D
8	3,88	E
5	3,84	F

Örneklerin fermentasyon süresi boyunca pH değerleri 0. günde en yüksek iken, 5.günde en düşük seviyede tespit edilmiştir. Örneklerin pH değerinde 5. güne kadar bir düşüş gözlenmiş daha sonraki günlerde de 3. günden düşük, 5. günden yüksek bir seviyede devam etmiştir. Fermentasyon süresi bakımından bütün günler birbirinden farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Birbirinden farklı olan günler farklı harflerle gösterilmiştir.

Fermentasyon süresi OTA konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Fermentasyon süresi ve örnekler arasındaki ilişkileri (interaksiyon) belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.27’de verilmiştir.

Fermentasyon süresi ve OTA konsantrasyonuna bağlı olarak pH değerlerine göre tüm örneklerin 0. günlerinde pH 4,80 olması ve en yüksek pH değerinin de 4,80 olması sebebiyle örneklerin 0. günleri A grubunda yer almıştır. C örneği 1. günde 4,68 pH ile B grubunda, B örneği de 1. günde C grubunda, A örneği 1. günde D grubunda K örneği 1. günde E grubunda yer almıştır. Örneklerde OTA konsantrasyonu arttıkça pH değerinde düşüşün yavaş olduğu tespit edilmiştir. pH değerindeki yavaş düşüşün de fermentasyonun yavaş seyretmesini, mayaların faaliyetini tam olarak yapamadıkları ihtimalini ortaya çıkarabilmektedir (Çizelge 4.27).

pH değerlerinin diğer değişkenlerle etkileşimini belirlemek için korelasyon testi uygulanmıştır. Korelasyon testi çizelgesi Ek 2 Çizelge 1’de verilmiştir. pH değeri ile asitlik arasında (CK: -945), alkol arasında (CK:-942) ve maya sayısı ile (CK:-385) ters orantılı bir ilişki bulunurken, şeker oranı ile (CK:946), su içerisinde çözünür kuru madde arasında (CK:929) doğru yönlü $p<0,01$ düzeyinde önemli bir ilişki bulunmuştur. Tespit edilen bu ilişkilere ilaveten OTA konsantrasyonu ile (CK:106) doğru yönlü önemsiz bir ilişki bulunmaktadır. pH değeri azaldıkça, asitlik oranında, alkol oranında, maya sayısında önemli bir artış gözlenirken, şeker oranında ve su içerisinde çözünür kuru madde oranında önemli bir azalma tespit edilmiştir. OTA konsantrasyonunda ise önemsiz bir azalma olduğu istatistiksel olarak korelasyon testinde ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.27. Örneklerin pH değerlerine göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Örnekler	Ferm.süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
K	0	4,80	A
	1	4,60	E
	3	3,98	H
	5	3,81	Q
	8	3,84	O
	10	3,89	L
A	0	4,80	A
	1	4,61	D
	3	4,05	F
	5	3,83	P
	8	3,90	K
	10	3,93	I
B	0	4,80	A
	1	4,64	C
	3	4,04	G
	5	3,86	N
	8	3,89	L
	10	3,90	K
C	0	4,80	A
	1	4,68	B
	3	4,15	G
	5	3,88	M
	8	3,88	M
	10	3,91	J

* Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

4.8. Fermentasyon Süresince Asitlikte (%) Meydana Gelen Değişiklikler

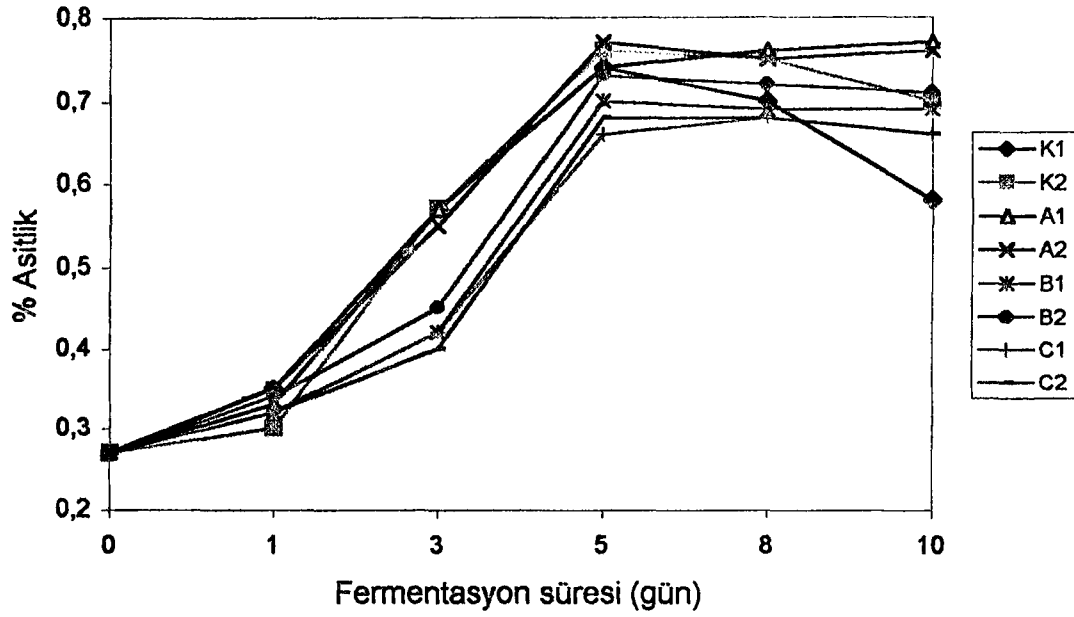
Fermentasyon başlangıcında asitlik, bütün örneklerde % 0,27 olup, 5. güne kadar bütün örneklerde asitlik artmıştır. 5. günde K örneğinin asitliği ortalama % 0,75, A örneğinde ortalama % 0,76, B örneğinde ortalama % 0,72 ve C örneğinde ortalama % 0,67 olmuştur. Asitlik değerleri 8. ve 10. günlerde sabit yada çok az seviyede değişmiştir. 10. günde asitlik değerleri ortalama olarak K örneğinde % 0,64, A örneğinde % 0,77, B örneğinde % 0,70 ve C örneğinde % 0,66 olmuştur.

Fermentasyon süresince asitlikte meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.28'de verilmiştir.

Çizelge 4.28. Fermentasyon süresince % asitlikte meydana gelen değişiklikler.

Örnek	Tekerrür	Fermentasyon Süresi (Gün)					
		0	1	3	5	8	10
K	1	0,27	0,35	0,57	0,74	0,70	0,58
	2	0,27	0,30	0,57	0,76	0,75	0,70
A	1	0,27	0,33	0,57	0,74	0,76	0,77
	2	0,27	0,35	0,55	0,77	0,75	0,76
B	1	0,27	0,32	0,42	0,70	0,69	0,69
	2	0,27	0,34	0,45	0,73	0,72	0,71
C	1	0,27	0,32	0,42	0,66	0,68	0,66
	2	0,27	0,32	0,40	0,68	0,68	0,66

Fermentasyon boyunca asitlikte (%) meydana gelen değişimler Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Fermentasyon süresince asitlikte (%) meydana gelen değişiklikler.

Şekil 4.10'dan da anlaşılabacağı gibi asitliği en yüksek olan örnekler K ve A olmuştur. B ve C'de asitlik ise diğer örneklerle yakın, ama daha düşük gelişmiştir. 5. güne kadar asitlikteki artış fazla iken, 8. ve 10. günlerde fazla değişmemiştir. K1 kontrol örneğinde 10. günde asitlikte çok az bir düşüş meydana gelmiştir. Fermentasyon süresince % asitlikte meydana gelen değişime ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.29'da verilmiştir.

Çizelge 4.29. Fermentasyon süresince asitlik (%) değerindeki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	0,000	0,001	3,37
Fermentasyon (A)	5	2,49	0,4982	0,10*
OTA Konsant. (B)	3	0,05	0,017	69,92*
Ferm.x OTA (AxB)	15	0,06	0,004	16,46*
Hata	46	0,01	0,000	-
Genel	71		-	

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Çizelge 4.29’da verilen varyans analizinde tekerrürler arasında farklılıklar önemsiz çıkarken, fermentasyon süresi ve örnekler arası farklılıklar ile fermentasyon süresi x örnekler arasındaki interaksiyon $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Önemli bulunan örneklere Duncan testi uygulanmıştır. Fermentasyon süresince örnekler arasındaki % asitlik değerlerine göre yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.30’da verilmiştir.

Çizelge 4.30. Fermentasyon süresince örnekler arasındaki % asitlik (laktik asit cinsinden) değerlerine göre Duncan testi sonuçları.

Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar
K	0,58	A
A	0,55	B
B	0,53	C
C	0,50	D

Yapılan Duncan testine göre % asitlik bakımından bütün örnekler birbirinden farklı gruplarda yer almıştır ($p<0,05$). % asitlik bakımından en yüksek K örneği bulunurken, örnek içerisinde OTA miktarı arttıkça % asitlik değeri düşmüştür. Örneklerdeki OTA konsantrasyonunun artışı asitliğin yavaş gelişimine sebep olmuştur. Örneklerin % asitlik değerlerine göre fermentasyon sürelerinin Duncan testi sonuçları Çizelge 4.31’de verilmiştir.

Çizelge 4.31. Örneklerin % asitlik değerlerine göre fermentasyon sürelerinin Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Fermentasyon süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar
8	0,72	A
5	0,72	B
10	0,69	C
3	0,49	D
1	0,33	E
0	0,27	F

% asitlik değerleri bakımından fermentasyon süreleri birbirinden farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Çizelge 4.31'e göre fermentasyonun her günü asitlik değerleri değişmiştir. Farklı olan günler farklı harflerle belirtilmiştir. % asitlik bakımından en yüksek 8. ve 5. günlerde meydana gelirken, 0. günde ise en düşük asitlik tespit edilmiştir.

Fermentasyon süresi ve OTA konsantrasyonunun (örnek) interaksyonu da birbirinden farklılık göstermektedir. Örneklerin asitlik değerlerine göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.32'de verilmiştir. Buna göre Asitlik (%) seviyelerine göre tüm örneklerde fermentasyonun 0. günleri % 0,27 olup S grubunda yer almıştır. Asitlik değerleri bakımından en yüksek A örneğinin 10. günü olup, A grubunda yer alırken, 5. ve 8. günlerinde B grubunda yer almıştır. Kontrol olan K örneğinde asitlik gelişimi 5. günde % 0,75 ile C grubunda yer almıştır. C örneğinde asitlik fazla gelişmemiş, asitlik en yüksek % 0,68 ile H grubunda yer almıştır. Asitlik gelişimi bakımından en yüksek K ve A örneği gözlenirken, B ve C örneklerinde daha düşük oranda asitlik gelişimi tespit edilmiştir. Örneklerdeki OTA konsantrasyonunun artışı asitliğin gelişimini etkilemiş, fermentasyonun daha yavaş ilerlemesine sebep olmuştur. Asitlik gelişiminde de yüksek OTA ihtiva eden örneklerde yavaş gelişme gözlenirken, kontrol örneklerinde ve içerisinde az OTA konsantrasyonu bulunan örneklerde (A) daha yüksek bir gelişme olduğu tespit edilmiştir.

Örneklerin asitlik (%) seviyelerinin diğer değişkenlerle etkileşimini belirlemek için korelasyon testi uygulanmıştır. Korelasyon testi Çizelgesi Ek 2; Çizelge1'de verilmiştir. Asitlik ile şeker arasında (CK:-964), pH ile (CK:-945), su içerisinde çözünür kuru madde ile (CK:-963) ters orantılı bir ilişki bulunurken, alkol oranı ile (CK:961) ve maya ile (CK:323) doğru orantılı $p<0,01$ düzeyinde önemli bir ilişki bulunmuştur. Tespit edilen bu ilişkilere ilaveten OTA konsantrasyonu ile asitlik arasında (CK:-162) ters yönlü önemsiz bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu korelasyon testinden, örneklerde asitlik seviyesi arttıkça, şeker oranında, pH değerinde, su içerisinde çözünür kurumadde miktarında önemli bir düzeyde azalma olduğu, maya sayısında ve alkol oranında da önemli düzeyde bir artış olduğu sonucuna varılmıştır. OTA

konsantrasyonunda ise asitlik seviyesinin tersine bir azalma olduğu, bu azalmanın istatistiki açıdan önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.32. Örneklerin % asitlik değerlerine göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Örnekler	Ferm.süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
K	0	0,27	S
	1	0,33	Q
	3	0,57	L
	5	0,75	C
	8	0,73	D
	10	0,64	K
A	0	0,27	S
	1	0,34	P
	3	0,56	M
	5	0,76	B
	8	0,76	B
	10	0,77	A
B	0	0,27	S
	1	0,33	Q
	3	0,44	N
	5	0,72	E
	8	0,71	F
	10	0,70	G
C	0	0,27	S
	1	0,32	R
	3	0,41	O
	5	0,67	I
	8	0,68	H
	10	0,66	J

* Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

4.9. Fermentasyon Süresince Alkol (%) Miktarında Meydana Gelen Değişiklikler

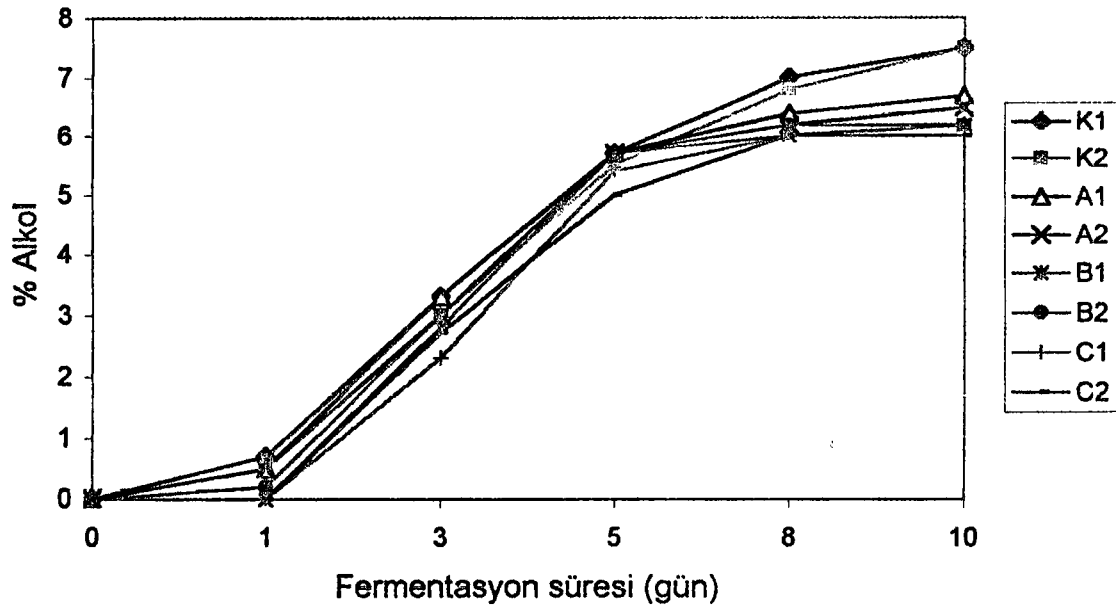
Fermentasyon süresince örneklerin alkol miktarlarında meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.33 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.

K örneğinde 10. günün sonunda %7,50 oranında alkol oluşurken, diğer örneklerde bu oran düşmüştür. A örneğinde ortalama % 6,60, B örneğinde ortalama % 6,20 ve C örneğinde % 6,00 oranında alkol oluşmuştur.

Çizelge 4.33. Fermentasyon süresince % alkol miktarında meydana gelen değişiklikler.

Örnek	Tekerrür	Fermentasyon Süresi (Gün)					
		0	1	3	5	8	10
K	1	0,00	0,70	3,30	5,70	7,00	7,50
	2	0,00	0,50	3,00	5,50	6,80	7,50
A	1	0,00	0,50	3,30	5,70	6,40	6,70
	2	0,00	0,50	3,00	5,70	6,20	6,50
B	1	0,00	0,00	2,80	5,70	6,00	6,20
	2	0,00	0,20	3,00	5,70	6,20	6,20
C	1	0,00	0,00	2,30	5,40	6,00	6,00
	2	0,00	0,00	2,70	5,00	6,00	6,00

Örnekler alkol miktarları göz önüne alındığında TS 2259 nolu “şişelenmiş ve kutulanmış biralar” standardına göre yüksek alkollü biralar sınıfına girmektedir (Anonymous, 1986). Tespit edilen alkol değerleri Krause (1997)’nin belirttiği değerlerden yüksek çıkmıştır.



Şekil 4.11. Fermentasyon süresince alkol oranında meydana gelen değişiklikler.

Fermentasyonun 0. gününde örneklerde alkol tespit edilememiştir. 1. günde C2 örneği haricinde çok az alkol oluşurken 3., 5. ve 8. günlerde alkol oranı artmıştır. 8. günden sonra da alkol oranındaki artış yavaşlamıştır. En düşük alkol C örneğinde oluşmuştur. Fermentasyon süresince alkol oranlarındaki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.34’de verilmiştir.

Çizelge 4.34. Fermentasyon süresince alkol oranlarındaki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	0,02	0,009	1,12
Fermentasyon (A)	5	532,60	106,520	12530,46*
OTA Konsant. (B)	3	4,50	1,499	176,30*
Ferm.x OTA (AxB)	15	3,09	0,206	24,20*
Hata	46	0,39	0,009	-
Genel	71	-	-	-

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Varyans analiz çizelgesine göre tekerrürler arasında farklılıklar önemsiz çıkarken, fermentasyon süreleri arasındaki farklılıklar, örnekler arasındaki farklılıklar ve bunların interaksiyonları $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Önemli bulunan varyasyon kaynaklarına Duncan testi uygulanmış ve sonuçları Çizelge 4.35’de verilmiştir.

Çizelge 4.35. Fermentasyon süresince örnekler arasındaki alkol oranlarına (%) göre Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar
K	3,96	A
A	3,71	B
B	3,50	C
C	3,28	D

Fermentasyon sonunda en yüksek alkol K örneklerinde oluşurken, örnekler içerisinde OTA seviyesi arttıkça alkol oluşumunda düşüş meydana gelmiştir. Örneklerdeki OTA konsantrasyonları, mayaların gelişmesini etkilemesinin yanında alkol oluşumunu da etkilemiştir. Örnekler alkol seviyelerine göre birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklılık göstermektedir. Farklı olan örnekler farklı harflerle gösterilmiştir. K örneği ortalama 3,96 ile A grubunda yer alırken içerisinde OTA konsantrasyonu en yüksek olan C örneğinde ortalama 3,28 ile D grubunda yer almıştır. Örneklerin alkol oranlarına göre fermentasyon sürelerinin Duncan testi sonuçları Çizelge 4.36’da verilmiştir.

Çizelge 4.36. Örneklerin alkol oranlarına göre fermentasyon sürelerinin Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Fermentasyon süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar
10	6,58	A
8	6,33	B
5	5,55	C
3	2,93	D
1	0,30	E
0	0,00	F

Fermentasyon süreleri boyunca alkol oranındaki farklılıklardan dolayı fermentasyon süreleri $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklı bulunmuştur. Fermentasyon boyunca her gün örneklerde alkol oranı artış göstermiştir. Örneklerdeki alkol oranındaki artış 5. günden sonra daha da yüksek olmuştur. Bu değişiklikleri belirlemek, örnekler arası ve fermentasyon sürelerinin ilişkilerini tespit etmek için Duncan testi uygulanmış ve farklılıklar tespit edilmiştir. Örneklerin alkol oranlarına göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.37’de verilmiştir.

Duncan testine göre K örneğinin 10. gününde en yüksek alkol seviyesi tespit edilmiş ve A grubunda yer almıştır. K örneğinin 8. gününde ortalama 6,90 ile B grubuna girerken, ancak A örneğinin 10. günü ortalama 6,60 ile C grubunda yer almıştır. Sıralanmada daha sonra A örneğinin 8. günü gelirken (D), sırasıyla B örneğinin 10. günü (DE) ve 8. günü (EF), C örneğinin 10. ve 8. günü (F) gelmektedir. Fermentasyon süresi boyunca örneklerin OTA konsantrasyonları arttıkça alkol oluşumunda bir azalma ve yavaşlama gözlenmiştir (Çizelge 4.37).

Alkol oranının (%) diğer değişkenlerle etkileşimini belirlemek için korelasyon testi uygulanmıştır. Korelasyon testi çizelgesi Ek 2; Çizelge1’de verilmiştir. Alkol oranı ile şeker oranı arasında (CK:-996), alkol oranı ile pH değeri arasında (CK:-942), alkol oranı ile su içerisinde çözünür kurumadde arasında (CK:-993) ters yönlü bir ilişki bulunurken, alkol oranı ile asitlik arasında (CK:961) doğru yönlü $p < 0,01$ düzeyinde önemli bir ilişki mevcuttur. Tespit edilen bu ilişkilere ilaveten OTA konsantrasyonu ile alkol oranı arasında (CK:-147) ters yönlü, maya sayısı ile alkol oranı arasında (CK:143) doğru yönlü önemsiz bir ilişki bulunmaktadır. Alkol oranı arttıkça, şeker oranındaki, pH değerindeki, su içerisinde çözünür kurumadde oranındaki azalma istatistiki açıdan önemli bulunurken, OTA konsantrasyonundaki azalma önemsiz bulunmuştur. Bunlara ilaveten alkol oranındaki artışa paralel olarak, maya sayısında da bir artış gözlenmiş, bu ikisi arasında da istatistiki açıdan önemsiz bir ilişki bulunmuştur.

Çizelge 4.37. Örneklerin alkol oranlarına göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Örnekler	Ferm.süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
K	0	0,00	M
	1	0,60	L
	3	3,15	I
	5	5,60	G
	8	6,90	B
	10	7,50	A
A	0	0,00	M
	1	0,50	L
	3	3,15	I
	5	5,70	G
	8	6,30	D
	10	6,60	C
B	0	0,00	M
	1	0,10	M
	3	2,90	J
	5	5,70	G
	8	6,10	EF
	10	6,20	DE
C	0	0,00	M
	1	0,00	M
	3	2,50	K
	5	5,20	H
	8	6,00	F
	10	6,00	F

* Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

4.10. Fermentasyon Süresince Su İçerisinde Çözünür Kurumadde (Brix) Oranında (%) Meydana Gelen Değişiklikler

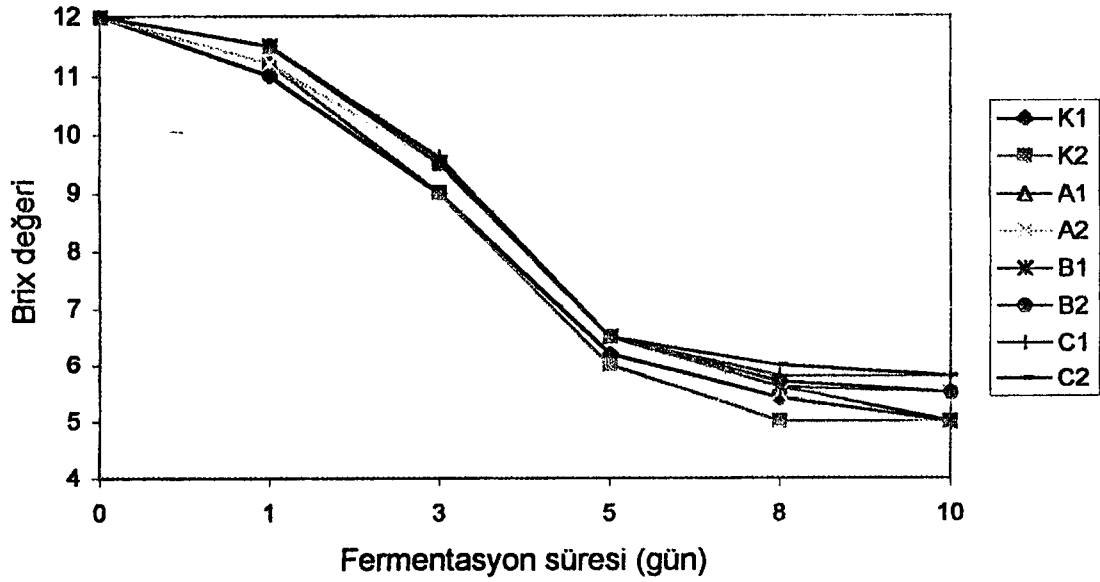
Fermentasyon süresi boyunca Brix değerinde düşüş meydana gelmiştir. Fermentasyon süresince brix değerinde meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.38’de ve Şekil 4.12’de verilmiştir.

Mayşenin Brix değeri fermentasyonun başlangıçta 12,0 iken 10. günü sonunda 5,0-5,8’e kadar düşmüştür. Fermentasyon boyunca en fazla düşüş 5. güne kadar meydana gelmiştir. 5. günde K örneği ortalama 6,1’e, diğer örnekler ise 6,5’e kadar düşmüştür. Fermentasyon sonunda ise (10. gün), K örneğinin Brix değeri ortalama 5, A örneğinin ortalama 5,5, B örneğinin ortalama 5,25 ve C örneğinin ortalama 5,8 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.38. Fermentasyon süresince brix değerinde meydana gelen değişiklikler.

Örnek	Tekerrür	Fermentasyon Süresi (Gün)					
		0	1	3	5	8	10
K	1	12,0	11,0	9,0	6,2	5,4	5,0
	2	12,0	11,2	9,0	6,0	5,0	5,0
A	1	12,0	11,2	9,5	6,5	5,6	5,5
	2	12,0	11,2	9,5	6,5	5,5	5,5
B	1	12,0	11,5	9,5	6,5	5,6	5,0
	2	12,0	11,5	9,5	6,5	5,7	5,5
C	1	12,0	11,5	9,6	6,5	5,8	5,8
	2	12,0	11,5	9,6	6,5	6,0	5,8

Tespit edilen değerler Connor ve ark. (2002)’nin bulgularına benzerken, Krause (1997)’nin belirttiği değerlerden yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.12. Fermentasyon süresince brix değerinde meydana gelen değişiklikler.

Fermentasyon başlangıcında bütün örneklerin brix değeri aynı iken 5. güne kadar tüm örneklerde birbirine yakın bulunmuştur. 5. günden sonra birbirinden farklılaşmaya başlamıştır. 8. ve 10. gün sonrasında en az kurumadde K örneklerinde tespit edilirken, en fazla kurumadde de C örneklerinde bulunmuştur. Bunun sebebi de OTA konsantrasyonuna bağlı olarak, örneklerde OTA seviyesi arttıkça maya faaliyeti etkilenmekte, Brix değerindeki düşüş de yavaş olmaktadır. Fermentasyon süresince Brix değerindeki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.39’da verilmiştir.

Çizelge 4.39. Fermentasyon Brix değerlerindeki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	0,000	0,002	0,29
Fermentasyon (A)	5	521,26	104,252	16552,35*
OTA Konsant. (B)	3	2,25	0,749	118,87*
Ferm.x OTA (AxB)	15	0,98	0,065	10,39*
Hata	46	0,29	0,006	-
Genel	71	-	-	-

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Brix değerlerine ait varyans analizinde tekerrürler arasındaki fark önemsiz bulunurken, örnekler arasında ve fermentasyon süreleri arasında farklılıklar ile bunların interaksiyonları $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı bulunan gruplara Duncan testi uygulanmıştır. Fermentasyon süresince Brix değerlerine göre örnekler arasında Duncan testi sonuçları Çizelge 4.40'da verilmiştir.

Çizelge 4.40. Fermentasyon süresince brix değerlerine göre örnekler arasındaki Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
C	8,55	A
B	8,41	B
A	8,38	B
K	8,07	C

* Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

Fermentasyonda Brix değeri en yüksek C tespit edilirken, daha sonra sırasıyla B, A ve K örnekleri gelmektedir. Örneklerden A ve B aynı gruba girerken diğerleri ise bu gruptan farklı grupta yer almışlardır. Birbirinden farklı olan gruplar farklı harflerle gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre örneklerde OTA konsantrasyonu arttıkça kurumadde, fermentasyon sonunda daha fazla kaldığı söylenebilir.

Örneklerin Brix değerlerine göre fermentasyon sürelerinin Duncan testi sonuçları Çizelge 4.41'de verilmiştir.

Çizelge 4.41. Örneklerin brix değerlerine göre fermentasyon süresin Duncan testi sonuçları ($p<0,05$)

Fermentasyon süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar
0	12,00	A
1	11,33	B
3	9,40	C
5	6,40	D
8	5,59	E
10	5,39	F

Fermentasyon süresi boyunca Brix değerlerinde düşüş meydana gelmiştir. Brix değerleri hergün değişmekle birlikte fermentasyon süreleri farklı gruplarda yer almışlardır. 0. günde en yüksek Brix değerine sahip olan örnekler 10. gün sonunda en düşük değerlere ulaşmıştır. Farklı olan fermentasyon günleri farklı harflerle gösterilmiştir.

Brix değerine göre fermentasyon süresi ve OTA konsantrasyonunun (örnek) interaksyonu birbirinden farklılık göstermiştir. Bu farklılıkları belirlemek için Duncan testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.42’de verilmiştir. Brix değerlerine göre fermentasyon sürelerinin 0. günlerinde örneklerin tümü en yüksek kurumaddeye sahip olup A grubunda yer almışlardır. C örneğinin 1. günü B grubunda, 3. günü C grubuna girerken K örneğinin 1. günü, A örneğinin 1. günü de C grubunda yer almıştır. En düşük kurumadde de K örneğinin 10. gününde olup, L grubunda yer almıştır. Fermentasyon süresi boyunca OTA konsantrasyonu fazla olan örneklerde kurumadde oranındaki azalmanın da yavaş olduğu tespit edilmiştir. OTA seviyesi fazla olan örneklerin fermentasyon sonunda daha fazla oranda kurumadde içeriği kalmıştır.

Örneklerin su içerisinde çözünür kurumadde miktarlarının (Brix) diğer değişkenlerle etkileşimini belirlemek için korelasyon testi uygulanmıştır. Korelasyon testi Ek 2; Çizelge 1’de verilmiştir. Su içerisinde çözünür kurumadde (Brix) ile asitlik arasında (CK:-963), Brix ile alkol arasında (CK:-993) ters yönlü bir ilişki bulunurken, şeker ile Brix arasında (CK:994), pH ile Brix arasında (CK:929) arasında doğru yönlü $p<0,01$ düzeyinde önemli bir ilişki bulunmuştur. Tespit edilen bu ilişkilere ilaveten OTA konsantrasyonu ile Brix arasında (CK:120) doğru yönlü, maya sayısı ile Brix arasında ters yönlü (CK:-124) önemsiz bir ilişki bulunmaktadır. Brix değeri düştükçe, asitlik değeri, alkol oranında önemli düzeyde bir artış gözlenirken, şeker oranında ve pH değerinde de önemli bir azalma tespit edilmiştir. Brix değerindeki düşüşe paralel olarak OTA konsantrasyonunda düşüş ve maya sayısında da önemsiz olan bir artış olduğu istatistiki olarak kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.42. Örneklerin % su içerisinde çözünür kurumaddeye (Brix) göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları ($p<0,05$)

Örnekler	Ferm.süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
K	0	12,00	A
	1	11,10	C
	3	9,00	E
	5	6,10	G
	8	5,20	K
	10	5,00	L
A	0	12,00	A
	1	11,20	C
	3	9,50	D
	5	6,50	F
	8	5,57	J
	10	5,50	J
B	0	12,00	A
	1	11,50	B
	3	9,50	D
	5	6,50	F
	8	5,70	I
	10	5,27	K
C	0	12,00	A
	1	11,50	B
	3	9,60	C
	5	6,50	F
	8	5,90	H
	10	5,80	HI

* Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

4.11. Fermentasyon Süresince Toplam Şeker Oranında (%) Meydana Gelen Değişiklikler

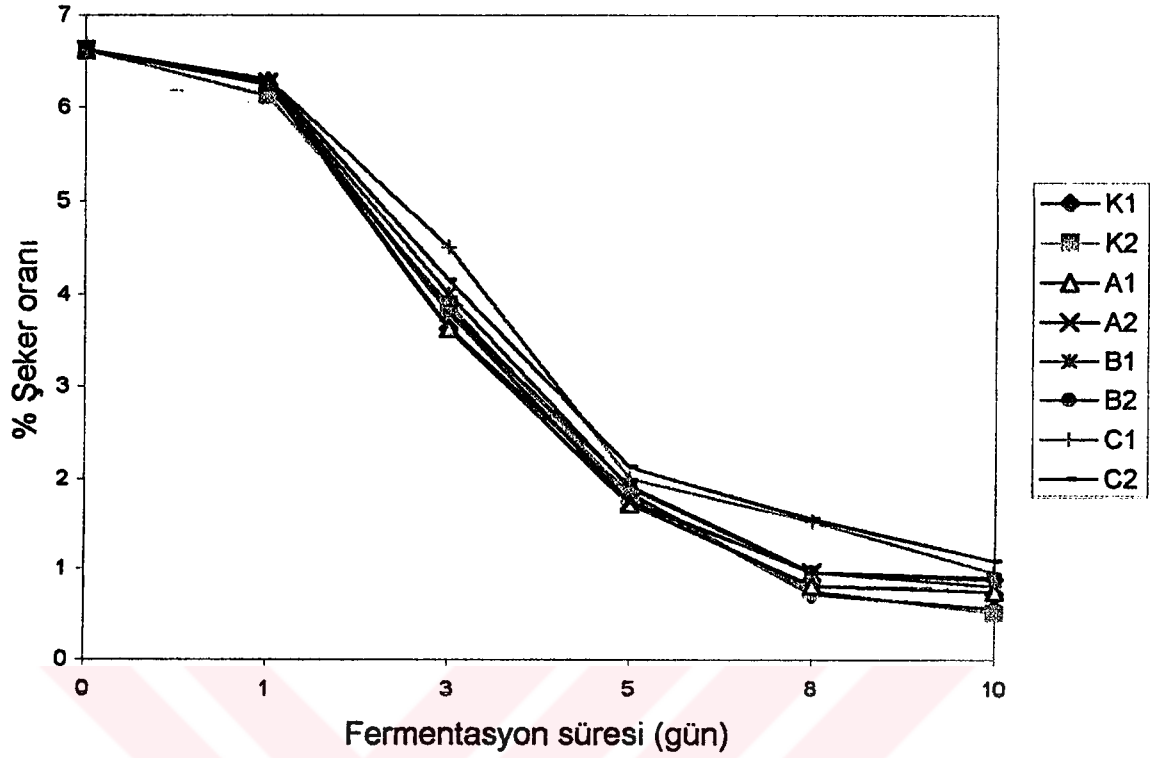
Fermentasyon süresince şeker oranlarında Brix değerlerine paralel olarak bir düşüş meydana gelmiştir. Şeker oranlarındaki değişiklik Çizelge 4.43’de verilmiştir.

Fermentasyon boyunca başlangıçta % 6,62 olan şeker miktarı tüm örneklerde düşüşe geçmiştir. Fermentasyonun 1. gününde şeker oranındaki düşüş çok yavaş iken, 3., 5. ve 8. günlerde şeker oranındaki düşüş hızlı olmuştur. 10. günde ise tekrar yavaşlamıştır. K örneğinde şeker oranı % 6,62’den ortalama % 0,52’e, A örneğinde % 6,62’den ortalama % 0,77’ye, B örneğinde % 6,62’den ortalama %0,88’e ve C örneğinde % 6,62’den %1,01’e düşmüştür.

Çizelge 4.43. Fermentasyon süresince % şeker oranında meydana gelen değişiklikler.

Örnek	Tekerrür	Fermentasyon Süresi (Gün)					
		0	1	3	5	8	10
K	1	6,62	6,25	3,63	1,84	0,71	0,55
	2	6,62	6,12	3,89	1,80	0,75	0,50
A	1	6,62	6,28	3,63	1,72	0,81	0,74
	2	6,62	6,27	3,80	1,75	0,96	0,80
B	1	6,62	6,27	4,00	1,90	0,95	0,87
	2	6,62	6,27	3,82	1,92	0,96	0,90
C	1	6,62	6,30	4,50	2,00	1,52	0,95
	2	6,62	6,30	4,15	2,12	1,55	1,08

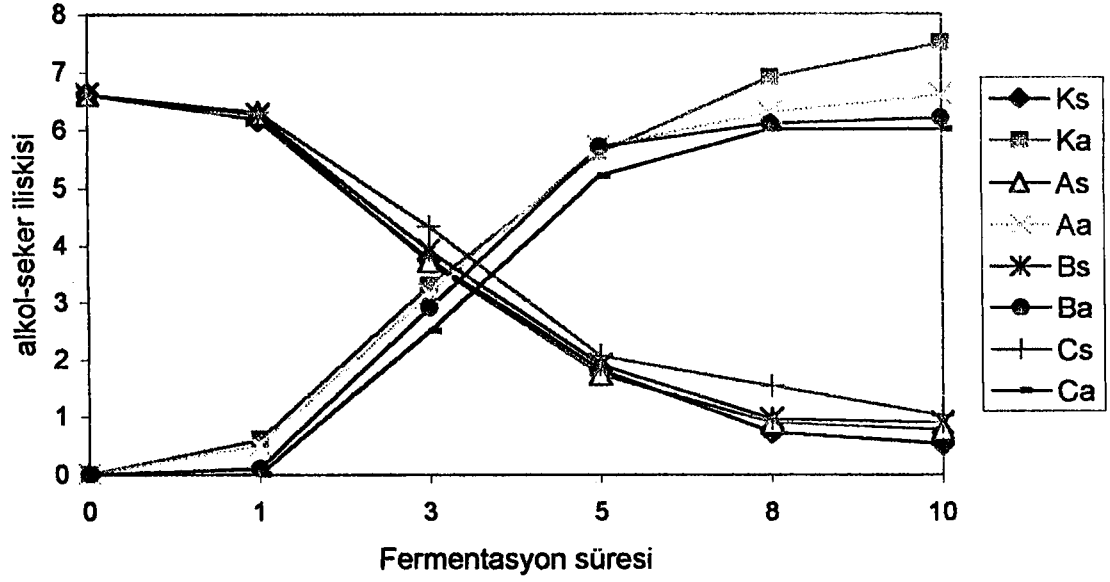
Tespit edilen değerler King ve Dickinson (2002)’un belirttiği değerlere benzerlik göstermektedir. Fermentasyon süresince şekerlerin oranlarında meydana gelen değişiklikler Şekil 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.13. Fermentasyon süresince şeker oranlarında meydana gelen değişiklikler.

Şeker miktarındaki azalmanın büyük bir bölümü fermentasyonun 1-8 gün arasında meydana gelmiştir. 5. gün sonuna kadar örnekler arasında paralellik bulunurken, 5. günden sonra C1 ve C2 örneklerinde daha az azalma tespit edilmiştir. Örneklerin şeker miktarlarındaki azalma ile mayaların faaliyeti sonucu alkol oluşumu arasında bir bağlantı kurulabilir. Fermentasyonun 1. gününde şeker oranında çok az bir düşüş olurken alkolde de buna paralel olarak çok az bir artış meydana gelmiştir. 1-3. günler arasında ise şeker oranında çok belirgin bir düşüşle birlikte alkolde de artış olmuştur. 8-10. günlerde şeker oranındaki azalma ile alkol oranındaki artış daha az olmuştur.

Şeker oranı ile alkol oranı arasındaki bağlantı Şekil 4.14'de verilmiştir.



(a) :alkol

(s): şeker

Şekil 4.14. Fermentasyon süresince şeker-alkol ilişkisi

Fermentasyon süresince şeker oranındaki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.44’de verilmiştir.

Çizelge 4.44. Fermentasyon süresince % şeker oranlarındaki değişime ilişkin varyans analiz sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	0,00	0,001	0,31
Fermentasyon (A)	5	402,01	80,403	21765,70*
OTA Konsant. (B)	3	1,43	0,477	129,25*
Ferm.x OTA (AxB)	15	1,00	0,067	18,09*
Hata	46	0,17	0,004	-
Genel	71	-	-	-

* $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucunda tekerrürler arasındaki farklılık önemsiz çıkarken, fermentasyon süresi ve örnekler arası farklılıklar ile bunların interaksiyonları arasındaki farklılıkları $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı olan örnekler Duncan testine tabi tutulmuştur. Fermentasyon süresince şeker oranlarına göre gruplar arasındaki Duncan testi sonuçları Çizelge 4.45’de verilmiştir.

Çizelge 4.45. Fermentasyon süresince % şeker miktarlarına göre örnekler arasındaki Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Örnekler	Ortalama Değerler	Sonuçlar
C	3,64	A
B	3,42	B
A	3,33	C
K	3,27	D

Duncan testine göre C örneğinde en yüksek şeker oranı tespit edilirken, K örneğinde şeker oranı en az seviyede bulunmuştur. Örneklerde OTA konsantrasyonu arttıkça şeker oranındaki azalma yavaşlamıştır. Fermentasyonda OTA konsantrasyonuna bağlı olarak şeker oranındaki azalma etkilenmiş ve sonuçta OTA konsantrasyonu fazla olan örneklerde fermentasyon tam olarak gerçekleşmemiştir. Şeker oranlarına göre bütün gruplar birbirinden farklı çıkmıştır. Farklı bulunan örnekler farklı harflerle ifade edilmiştir. Örneklerin % şeker miktarlarına göre fermentasyon sürelerinin farklılıkları Duncan testinde Çizelge 4.46’da verilmiştir.

Çizelge 4.46. Örneklerin % şeker miktarlarına göre fermentasyon süresindeki farklılıkların Duncan testi sonuçları ($p<0,05$).

Fermentasyon süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar
0	6,62	A
1	6,26	B
3	3,92	C
5	1,88	D
8	1,03	E
10	0,80	F

Şeker oranlarına göre fermentasyon süreleri birbirinden farklı çıkmıştır. Farklı olan günler farklı harflerle gösterilmiştir. 0. günde en yüksek oranda şeker tespit edilirken 10. günde en az şeker bulunmuştur. Fermentasyon süresince şeker miktarında hergün bir azalma gözlenmiştir. Örneklerdeki OTA konsantrasyonu arttıkça fermentasyon sürelerinde bir gecikme olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkları ortaya koymak için fermentasyon süresi ile OTA konsantrasyonunun (örnek) interaksyonu Duncan testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.47’de verilmiştir.

Çizelge 4.47’e göre örnekler şeker oranlarına göre fermentasyonun 0. gününde en yüksek değere sahip olup A grubunda yer almıştır. C örneğinin 1. günü de B grubunda yer alırken, B ve A örneğinin 1. günleri (BC), K örneğinin 1. günü (C) grubunda yer almıştır. Fermentasyonun 10. gününde ise en fazla şeker bulunduran C örneği, K grubunda, B örneği L grubunda, A örneği M grubunda ve K örneği de N grubunda yer almıştır. Örneklerin içindeki OTA konsantrasyonu arttıkça fermentasyon sürelerinde gecikme ve şeker oranlarında da daha az parçalanma gözlenmiştir.

Örneklerin şeker oranlarının diğer değişkenlerle etkileşimini belirlemek için korelasyon testi uygulanmıştır. Korelasyon testi Ek 2; Çizelge 1’de verilmiştir. Şeker oranları ile asitlik arasında (CK: -994), şeker oranı ile alkol arasında (CK:-996) ters yönlü ilişki bulunurken, pH ile şeker oranı arasında (CK:946), kurumadde ile şeker oranı arasında (CK:994) doğru yönlü $p<0,01$ düzeyinde önemli bir ilişki bulunmuştur. Tespit edilen bu ilişkilere ilaveten OTA konsantrasyonu ile şeker oranı arasında (CK:117) doğru yönlü, Maya sayısı ile şeker oranı arasında (CK:-135) ters yönlü önemsiz bir ilişki bulunmaktadır. Şeker seviyesindeki düşüş ile, asitlik değerinde, alkol oranında önemli bir artış tespit edilirken, pH değeri, su içerisinde çözünür kurumadde seviyesinde bir artış olduğu istatistiki olarak kanıtlanmıştır. Ayrıca şeker oranındaki düşüş, OTA konsantrasyonundaki düşüş ve maya sayısındaki artış arasında istatistiki açıdan önemsiz bir ilişki bulunmuştur.

Çizelge 4.47. Örneklerin % şeker oranlarına göre fermentasyon süresi x örnekler arasında yapılan Duncan testi sonuçları ($p<0,05$)

Örnekler	Ferm.süresi	Ortalama Değerler	Sonuçlar*
K	0	6,62	A
	1	6,19	C
	3	3,74	F
	5	1,82	HI
	8	0,73	M
	10	0,53	N
A	0	6,62	A
	1	6,28	BC
	3	3,70	F
	5	1,74	I
	8	0,89	L
	10	0,77	M
B	0	6,62	A
	1	6,27	BC
	3	3,89	E
	5	1,91	H
	8	0,96	KL
	10	0,89	L
C	0	6,62	A
	1	6,30	B
	3	4,33	D
	5	2,06	G
	8	1,54	J
	10	1,01	K

* Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmada 135 adet yerli ve 15 adet ithal toplam 150 bira örneğinin 53 adedinde OTA bulunmuştur. Örneklerden 1 tanesinde birçok ülke tarafından sınır kabul edilen 5 µg/l'nin üzerinde OTA bulunurken, 7 adet yerli ve 2 adet de ithal bira da olmak üzere toplam 9 adet bira örneğinde OTA miktarı bazı ülkeler tarafından tavsiye edilen sınır değer olan 3 µg/l'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. İncelenen bira örneklerinin % 35,32'sinde 0,01 ile 8,10 µg/l arasında OTA tespit edilmiştir. OTA pozitif örneklerin % 0,66'sı izin verilen en yüksek OTA miktarı olan 5 µg/l'yi aştığı belirlenmiştir. Buna göre Türkiye'de üretilen ve tüketilen biralara OTA konsantrasyonu bakımından Avrupa'daki üretilenlere göre daha güvenli oldukları söylenebilir.

OTA varlığı bakımından incelenen 25 adet malt örneğinin sadece birinde OTA bulunmazken, 24 adedinde 0,2 ile 6,6 µg/kg arasında OTA tespit edilmiştir.

30 adet arpa örneğinin 27'sinde 12 µg/kg'a varan oranlarda OTA tespit edilmiştir. Arpa ve malt örneklerinde yüksek düzeyde OTA tespit edilmesi bu ürünlerin depolama şartları ve üretim aşamalarındaki şartların uygun olmadığı sonucunu göstermektedir. Arpaların hasat sırasındaki hava durumu, bitkinin durumu, depolama şartları, havanın nemi, arpanın depolama esnasında rutubet miktarı, OTA oluşumunu etkileyen başlıca faktörlerdir. Ürünlerin hasat edilince uygun şartlarda depolanması, depoların havalandırılması, arpaların nem oranının % 13,5-14'ün altında olması küflerin gelişimini ve OTA oluşumunu engellemektedir.

Arpa ve malta tespit edilen OTA miktarı son ürün olan biradan yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla bira fermentasyonu sırasında belirli bir azalmanın olabileceği dikkate alınarak, laboratuvar şartlarında bira fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. OTA kontamine edilen mayşede fermentasyon süresince OTA seviyelerindeki değişiklikler incelenmiştir. Buna göre yaklaşık 10 ppb OTA ilave edilen örnekte fermentasyon sonunda (10. gün) OTA seviyesinde % 24,97 oranında azalma tespit edilirken, yaklaşık 20 ppb OTA ilave edilen örneğin OTA seviyesinde %18,74 bir azalma olduğu görülmüştür. Yaklaşık 30 ppb OTA ilave edilen örnekte ise en az düzeyde bir azalma

(%8,9) olduğu tespit edilmiştir. Buradan fermentasyonda OTA miktarının artması ile OTA'daki parçalanma oranının azaldığı sonucuna varılabilir. Bu sebepten bira üretiminde ham madde olarak kullanılan arpa ve dolayısıyla maltların OTA kontaminasyonunun tespiti önem taşımaktadır. Hammaddedeki OTA miktarı ne kadar artarsa ürüne geçiş o oranda fazla olmaktadır. OTA seviyesi düşük olan hammaddede ise fermentasyon sırasında, OTA'nın belirli oranda parçalanması ile tüketici açısından risk de azaltılmış olacaktır.

Fermentasyon süresi boyunca OTA konsantrasyonu maya gelişimini etkilemiş, OTA ihtiva eden örneklerde maya gelişimi daha yavaş olmuştur. Bu sonuç agar difüzyon yöntemi ile de doğrulanmıştır. Agar difüzyon yönteminde OTA konsantrasyonu arttıkça oluşan şeffaf zon çapı da artmıştır. OTA konsantrasyonunun artması ile fermentasyon sırasında mayaların gelişiminde bir yavaşlama gözlenmiştir. Dolayısıyla yüksek OTA konsantrasyonlu örneklerde maya sayısının yavaş artması fermentasyonun hızını yavaşlatmakla birlikte fermentasyon süresinin de uzamasına sebep olabilmektedir.

Fermentasyon boyunca pH değerinde, OTA seviyesi fazla olan örneklerde, az olanlara göre daha yavaş düşüş gözlenmiştir. Fermentasyon süresince OTA konsantrasyonuna bağılı olarak örneklerde OTA konsantrasyonu arttıkça Brix ve şeker oranları da fazla bulunmuştur. Yani mayaların şekerleri kullanması azalmıştır. Brix değeri kontrol örneklerinde % 5 iken, içerisinde 30 ppb OTA bulunduran örnekte % 5,8 olarak tespit edilmiştir. Bu tespit şeker oranı için de geçerlidir. OTA konsantrasyonu yüksek olan örneklerde alkol oluşumu düşük seyrederken, OTA konsantrasyonu az olan örneklerde alkol oranı daha yüksek tespit edilmiştir.

Sonuç olarak fermentasyon esnasında OTA seviyesinde belirli bir oranda azalma görölse bile, insan sağığını doğrudan etkileyen gıda maddelerinin bazı asgari normlar içinde üretilmesi, üretimin her aşamasında standartlara uygunluk kontrollerinin yapılması gerekmektedir. Halk sağığını direkt ilgilendiren ürünlerin denetlenmesindeki problemler ve mikotoksin sorununa yetkili tarafından sahip çıkılması gerekmektedir.

Bira üretiminde kullanılan hammaddelerin üretiminde kritik kontrol noktalarının belirlenmesi, kalite kontrol programlarının uygulanması, kaliteli ürün için önem taşımaktadır. Bu konuda yapılacak araştırmalar desteklenmelidir. Denetimler çok sağlıklı bir biçimde yapılmalıdır. Tüketicuyu bu toksik maddelerden koruyabilmek için de önlemler alınmalıdır. Küflerle kontamine olmuş, sağlığa zararlı ve hastalık etmeni olabilecek ürünlerin denetlenmesinde yasal düzenlemelerin çok belirleyici olma zorunluluğu vardır.



KAYNAKLAR

- Abarca, M.L., Braugulat, M.R., Castella, G., Cabanes, F.J. 1994.** Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2650-2652.
- Abramson, D., Sinha ,R.N., Mills, J.T. 1980.** Mycotoxin and odor formation in moist cereal grain during granary storage. Cereal Chemistry. 57: 346-351.
- Abramson, D., Hulasare, R., White, N.D.G., Jayas, D.S.,Marquardt, R.R. 1999.** Mycotoxin formation in hulless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content, J. Stored Products Res., 35:297-305.
- Akkurt, C. 1991.** Değişik Rutubetlerde Depolanan Bazı Mısır Çeşitlerinde Aflatoksin Oluşumu Üzerinde Araştırmalar, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Yüksek Mühendislik Tezi, Ankara.
- Almeida, R.B., Silva, J.B.A.E., Lima, U.A., Silva, D.P., Assis, A.N., 2001.** Evaluation of fermentation parameters during high-gravity beer production, Brazilian J. of Chemical Engineering, 18:459-465.
- Anonymous, 1977.** Report of the Joint FAO/ WHO/ UNEP Conference on Mycotoxins, Nairobi. 19-27. September.
- Anonymous, 1986.** Türk Standartları Enstitüsü, Şişelenmiş ve Kutulanmış Biralara Standardı, TSE 2259, Kasım 1986.
- Anonymous, 1988.** Gıda Maddeleri Muayene ve Analiz Metodları kitabı, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Anonymous, 1990a.** WHO, Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. Report an Expert Committee. Geneva, World Health Organization, (Environmental Health Criteria No: 105).

Anonymous, 1990b. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. Method Nr. 935.62, p.1017, Arlington, Virginia, USA.

Anonymous, 1991. WHO, Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, Food Additives series 28, The 37th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on the food additives, Geneva.

Anonymous, 1997a. Food Agriculture Organisation of The United Nations, Worldwide regulations for mycotoxins 1995, Rome, 1997.

Anonymous, 1997b. Survey of aflatoxins and ochratoxin A in cereals and retail products, MAFF, Food Surveillance information sheet, Joint Food Safety and Standards Groups.

Anonymous, 1997c. Türk Gıda Kodeks Yönetmeliği, T.C. Resmi Gazete, Sayı: 23172.

Anonymous, 1998. Codex Alimentarius Commission, Joint WHO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on food additives and contaminants, Thirty-first Session, The Hague, The Netherlands, 22-26 March 1999.

Anonymous, 1999a. Ridascreen Ochrotoxin A. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Ochrotoxin A. r-Biopharm GmbH, Germany.

Anonymous, 1999b. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Surveillance of UK cereals for Ochrotoxin A. Food Surveillance information sheet 171, London.

Anonymous, 2000a. Codex alimentarius commission, Joint WHO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on food additives and contaminants, Thirty-second Session, Beijing, People's Republic of China, 20-24 March 2000.

Anonymous, 2000b. Devlet Planlama Teşkilatı 8. beş yıllık kalkınma planı, içki sanayii özel ihtisas komisyonu raporu, Ankara.

- Anonymous, 2001a.** Codex Alimentarius Commision, Joint WHO/WHO Food Standarts Programme, Codex Committee on food additives and contaminants, Thirty-third Session, The Hague, The Netherlands, 12-16 March.
- Anonymous, 2001b.** Joint FAO/WHO Expert committee on Food additives, Fifty-sixth meeting, Geneva.
- Atkins, D., Norman, J. 1998.** Mycotoxins and Food Safety. Nutrition and Food Science. Number 5 September, pp. 260-266, MCB University Press.
- Axberg, K., Jansson, G., Swensson, G., Hult, K. 1997.** Varital differences in accumulation of ochratoxin A in barley and wheat cultivars after inoculation of *Penicillium verrucosum*. Acta Agric. Scandinavica sec. B-soil and plant science, 47: 229-237.
- Bach, P.H. 1991.** A molecular basis for target-cell toxicity and upper urothelial carcinoma in analgesic abusers and patients with Balkan endemic nephropathy, In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 215-227.
- Bauer, J., Gareis, M. 1987.** Ochratoxin A in the food chain, J.Vet. Med. B, 34:613-627.
- Baumgart, J., 1993.** Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Beh's Verlag, Hamburg.
- Baxter, E.D., Slaiding, I.R., Kelly, B. 2001.** Behavior of ochratoxin A in brewing, J. Amer. Soc. of Brewing Chem., 59:98-100.
- Betina, V. 1989.** Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects. Elsevier, Amsterdam.

- Bottalico, A. 1987.** Mycotoxins in Food with Possible Health Implications. In: "Food Safety and Health Protection, Eds. C. Lintans and M.A. Spadoni, Progetto finalizzato: IPRA".
- Breitholtz, A., Olsen, M., Dahlback, A., Hult, K. 1991.** Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique, Food Addit. Contam. 8:183-192.
- Bresch, H., Urbanek, M., Hell, K. 2000.** Ochratoxin A in coffee, tea and beer., Archiv für Lebensmittelhyg., 51: 89-94.
- Bridge, P.D., Hawksworth, D.L., Kozakiewicz, Z., Onions, A.H.S., Patterson, R.R.M., Sackin, M.J., Sneath, P.H.A. 1989.** A reappraisal of terverticillate penicillia using biochemical, physiological and morphological features. I. Numerical taxonomy. J.Gen. Microbiol. 135: 2941-2966.
- Bullerman, L.B. 1978.** Methods for detecting mycotoxins in foods and beverages: Food and beverage mycology, L.R. Beuchat (Ed) AVI Publishing Company Inc. Westport Con. 445-469.
- Ceovic, S., Plestina, R., Miletic-Medved, M., Stavljenic, A., Mitar, J., Vukelic, M. 1991** Epidemiological aspects of Balkan endemic nephropathy in a typical focus in Yugoslavia, In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 5-10.
- Cemeroğlu, B. 1992.** Meyve ve Sebze İşleme Endüstrisinde Temel Analiz Metodları, Biltav Üniversite kitapları, Yayın No: 02-2, sayfa no 228-237, Ankara.
- Charles, R., Hurburgh, JR. 1995.** Mycotoxins in the Grain Market. World Grain, October, pp 23-26.

- Chelkowski, J., Golinski, P., Szebiotko, K. 1981.** Mycotoxins in cereal grain. Part II. The fate of ochratoxin A after processing of wheat and barley grain. *Nahrung*, 25, 423-426.
- Chelkowski, J., Samson, R.A., Wiewiorowska, M., Golinski, P., 1987.** Ochrotoxin A formation by isolated strains of the conidial stage of *Aspergillus glaucus* from cereal grains. *Nahrung* 31: 267-270.
- Chu, F.S. 1974.** Studies on ochrotoxins. *CRC Crit. Rew. Toxicol.* 2: 499-524.
- Chu, F.S., Chang, C.C., Ashoor, S.M., Prentice, N. 1975.** Stability of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in brewing. *Appl. Microbiol.* 29: 313-316.
- Ciegler, A. 1972.** Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of *Aspergillus ochraceus* group. *Can. J. Microbiol.* 18:631-636.
- Coker, R.D., Jones, B.D., Nagler, M.S., Gilman, G.A., Wallbridge, A.J., Panigrahi, S., 1984.** Mycotoxin training manual: Tropical Development and Research Institute, London.
- Çoksöyler, N; Özkaya, Ş. 1987.** Sağlam Kabuklu Fındıkta *Aspergillus flavus* penetrasyonu ve toksin oluşumu, X. Ulusal Biyoloji Kongresi Kitabı cilt 1, 179-183.
- Connor, B.O., Riverol, C., Kelleher, P., Plant, N., Bevan, R., Hinchey, E., Arcy, J.D. 2002.** İntegration of fuzzy logic based control procedures in brewing, *Food Control*, 13:23-31.
- Creppy, E.E., Betbeder, A.M., Gharbi, A., Counord, J., Castegnaro, M., Bartsch, H., Moncharnont, P., Fouillet, B., Chambon, P.,Dirheimer, G. 1991.** Human Ochrotoxicosis in France, In: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours*, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 145-151.

- Creppy, E.E. 1999.** Human ochratoxicosis, *J. Toxicology-Toxin Rev.*, 18:277-293.
- Damaglou, A.D., Downey, G.A., Shannon, W. 1984.** The production of ochratoxin A and citrinin in barley, *J. Science Food Agric.* 35:395-400.
- Davis, N.D., Diener, U.L. 1978.** *Mycotoxins: Food and beverage mycology*, Ed: L.R. Beuchat, AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, 397-444.
- Degelmann, P., Becker, M., Herderich, M., Humpf, H.U. 1999.** Determination of ochratoxin A in beer by high-performance liquid chromatography, *Chromatographia*, 49:543-546.
- Dietrich, R, 1989.** Applicability of enzyme immunoassays for detection of some mycotoxins (Aflatoxin B, Aflatoxin M, Ochratoxin A, Zearalenone, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, roridin A) in food of animal and plant origin. Ludwig-Maximilians Universität München, German Federal Republic 167 pp.
- Dirheimer, G., Creppy, E.E. 1991.** Mechanism of action of ochratoxin A, In: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours*, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 171-186.
- Drews, G. 1974.** *Mikrobiologisches Praktikum*. Springer-Verlag, Berlin.
- Elling, F. 1983.** Feeding experiments with ochratoxin A-contaminated barley to bacon pigs. 4. Renal lesions. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 33: 153-159.
- Emanuelsson, A.B., Hult, K. 1991.** Enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of ochratoxin A in human plasma samples using antibodies raised against a new ochratoxin-protein conjugate, In: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours*, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 89-92.

- Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benayada, A., Creppy, E.E. 2001.** Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey, *Food Additives and Contaminants*, 18:565-568.
- Fuchs, R., Radic, B., Ceovic, S., Sostaric, B., Hult, K. 1991.** Human exposure to ochratoxin A, In: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours*, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 131-135.
- Fukal, L., 1990.** A survey of cereals, cereals products, feedstuffs and porcine kidneys for ochratoxin A by RIA, *Food Addit. and Contam.*, 72: 253-258 (Alınmıştır, Karagözlü: 2000).
- Frank, H.K. 1991a.** Food contamination by ochratoxin A in Germany, *Mycotoxins In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours*, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 77-81.
- Frank, H.K. 1991b.** Risk estimation for ochratoxin A in European countries In: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours*, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 321-325.
- Frisvad, J.C., Viuf, B.T. 1986.** Comparison of direct and dilution plating for detecting *Penicillium viridicatum* in barley containing ochratoxin. *Methods for the mycological examination of food*, Plenum Press, New York, USA; 45-47.
- Gareis, M., Martlbauer, E., Bauer, J., Gedek, B. 1988.** Determination of ochratoxin A in breast milk. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 186:114-117.
- Gareis, M. 1999.** Contamination of German malting barley and malt-produced from it with the mycotoxins ochratoxin A and B. *Archiv für Lebensmittelhyg.*, 50:83-87.

- Gjerten, P., Trolle, B., Andersen, K. 1963.** Weathered barley as a contributory cause of gushing in beer. In: Proceeding 9 th Congr. Eur. Brewery Conv., Brussels, Elsevier, Amsterdam, pp. 320-341.
- Gjerten, F., Myken, F., Krogh, P., Hald, B. 1973.** Malting and brewing experiments with ochratoxin and citrinin, In Proc. 14th. Congr. Eur. Brewery conven., Salzburg, Austria, pp. 373-380.
- Golinski, P 1987.** Ochratoxin A in humans as a result of food and feed contamination, Thesis, Poznan, Rochznalio Akademii Rolniczej.
- Golinski, P., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Chelhowski, J., Hult, K., Kostecki, M. 1991.** Possible sources of ochratoxin A in human blood in Poland, In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 153-158.
- Goto, T. 1990.** Mycotoxins: current situation. Food Rew. Inter. 6 : 265-290.
- Gürgün, V., Ayhan, K., Çoksöyler, N. 1995.** Mikotoksinler ve Analiz Yöntemleri Kursu Notları, Ankara.
- Hagelberg, S., Hult, S., Fuchs, R. 1989.** Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. J.Appl. Toxicol., 9:91-56.
- Hagblom, P. 1982.** Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: effect of fungal growth, time, temperature and inoculum size, Appl. and Environ. Microbiol., 43: 1205-1207.
- Hald, B., Krogh, P. 1975.** Detection of ochratoxin A in barley, using silicagel minicolumns. J. Assoc. Offical Chemists 58:156-158.
- Hald, B. 1989.** Human exposure to ochratoxin A. In: Mycotoxins and Phycotoxins, Ed: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y., Amsterdam, Elsevier Science Pub.

- Hald, B. 1991a.** Porcine nephropathy in Europe, Mycotoxins, In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 49-56.
- Hald, B. 1991b.** Ochratoxin A in human blood in European countries, In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 159-164.
- Henning, A., Fing-Gremmels, J., Leistner, L. 1991.** Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation, In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 225-260
- Hohler, D. 1998.** Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action, *Z. Ernährungswissenschaft*, 37:2-12.
- Hokby, F., Hult, K., Gatenbeck, S., Rutqvist, L. 1979.** Ochratoxin A and citrinin in 1976. Crop of barley stored on farms in Sweden. *Acta Agriculture Scandinavica* 29: 174-178.
- Hult, K., Plestina, R., Habazin-Novak., Radic, V., Ceovic, S. 1982.** Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Arch. Toxicol.*, 51:313-321.
- IARC, 1983.** Ochratoxins. IARC monographs. reasonably anticipated to be a human carcinogen, ninth report on carcinogenes.
- IARC 1987.** Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. Report of an IARC Expert Committee, Lyon.
- Idler, C., Ehrich, J., Hagemann, L., Fuchs, H. 1996.** The preservation of food grain by spice oils. *Wirtschaftsergane fulter*, 42: 137-142.

- Jay, J.M. 1992.** Modern Food Microbiology. Pub. by van Nostrand Reinhold, New York., pp. 648-649.
- Jiao, Y., Blass, W., Ruhl, C., Weber, R. 1994.** Ochratoxin A in Foodstuffs (Vegetables, Cereals, Cereal Products and Beer). Deut. Lebensmittel-Rundschau, 90:318-321.
- Josefsson, E. 1976.** Ochratoxin in barley and oat products. Var. Foda, 28: 206-209.
- Kane, A., Dop, N., Diack, T.S. 1991.** Natural occurrence of ochratoxin A in food and feed in Senegal, Mycotoxins, In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 93-96.
- Karagözlü, N., Karagözlü, C. 2000.** Süt ve süt ürünlerinde okratoksinler, Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri kitabı, Ed: Demirci, M., sayfa 390-398.
- Kaya, S., Yavuz, H., Akar, F. 1990.** Bazı yağlı tohum küspelerinde mikotoksin kalıntıları, A.Ü. Veterinerlik Fak. Dergisi 37: 173-180.
- Kerkadi, A., Barriault, C., Tuchweber, B., Frohlich, A.A., Marquardt, R.R., Bouchard, G., Yousef, I.M. 1998.** Dietary cholestyramine reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels and enhancing fecal excretion of the toxin, J. Toxicol. Environ. Health-Parta, 53: 231-250.
- King, A.J., Dickinson, J.R. 2002.** Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts, Fems Yeast Research "Article in press" 1510:1-10.
- Kostecki, M., Golinski, P., Uchman, W., Grabarkiewicz-Szczesna, J. 1991.** Decomposition of Ochratoxin A by heat and γ -Irradiation, In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 109-111.

- Krause, U. 1997.** Bier Brauen, Sudwest Verlag GmbH. And Co, KG, München.
- Krämer, J. 1992.** Lebensmittel-Mikrobiologie. Eugen ulmer GmbH., Stuttgart.
- Krogh, P. 1974.** Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan Endemic Nephropathy In: Endemic Nephropathy, Proceeding of the second International Symposium on Endemic Nephropathy, Pacher A. ed. Bulgarian Academy of Science, Sofia, pp. 266-270.
- Krogh, P., Hald, B., Gjersten, P., Myken, F. 1974a.** Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments. App. Microbiol. 28: 31-34.
- Krogh, P., Hald, P., Englund, P., Rutqvist, L., Swahn, O. 1974b.** Contamination of swedish cereals with mycotoxic porcine nephropathy. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 81:689-695.
- Krogh, P. 1977.** Natural occurrence of ochratoxin A, a kidney-toxic mold metabolite in scandinav cereals. Zeszyty Problemowe Posttepow Nauk Rolniczych., 189: 22-24.
- Krogh, P., Hald, B., Plestina, R., Ceovic, S., 1977.** Balkan (Endemic) nephropathy and food-borne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuff. Acta Pathol. Microbiology Scand. Sect. B 85:153-159.
- Krogh, P., Hald, B., Christensen, D.H. 1984.** Viomellein A mycotoxin causing kidney damage (in swin), detected in barley. Dansk Veterinaertisskrift, 67: 123-126.
- Krogh, P. 1987.** Mycotoxins In Food, Academic Press Limited, Denmark, pp. 97-121
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M. 1989.** Risk assesment of the mycotoxin ochratoxin A. Environ. Sci. 2:179-248.
- Lacey, J. 1989.** Pre and post harwest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products, J. Appl. Bacteriol., Symposium Suppl. 11-25.

- Lacey, J., Ramakrishna, N., Candlish, A.A.G., Smith, J.E. 1991.** Immunoassay of ochratoxin and other mycotoxins from a single extract of cereal grain utilizing monoclonal antibodies. In: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours*, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 97-103.
- Lea, T., Steien, K., Stormer, C., 1989.** Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 107:153-159.
- Maarofi, K. Achour, A., Betbeder, A.M., Hammami, M., Ellouz, F., Creppy, E.E., Bacha, H. 1995a.** Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Archiv Toxicology*, 69:552-558.
- Maarofi, K. Achour, A., Hammami, M., El May, M., Betbeder, A.M., Ellouz, F., Creppy, E.E., Bacha, H. 1995b.** Ochratoxin A in human blood in relation to nephropathy in Tunisia, Human Experiment. *Toxicol.*, 14: 609-615.
- Marquardt, R.R., Frohlich, A.A 1992.** A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim.Sci.* 70: 3968-3988.
- Micco, C., Ambrozzi, M.A., Miraglia, M., Brera, C., Onori, R., Benelli, L. 1991.** Contamination of human milk with ochratoxin A. In: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours*, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 105-108.
- Mirocha, C.J., Pathre, S.V., Chritensen, C.M., 1980.** Mycotoxins. "Advances in Cereal sci. and Technol.", 3:159-203, (Alınmıştır: Karagözlü, 2000).
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. 1999.** A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography, *J. AOAC Int.*, 82: 897-902.

- Nip, W.K., Fred, C., Chang, F.S., Chu, Prentice, N. 1975.** Fate of ochratoxin A in brewing., App. Microbiol., 30: 1048-1049.
- Noots, I., Delcour, J.A., Michiels, C.W. 1999.** From field barley to malt: Detection and specification of microbial activity for quality aspects. Crit. Rev. Microbiol., 25:121-153.
- Odhaw, B., Naicker, V. 2002.** Mycotoxins in South African traditional brewed beers. Food Addit. and Contam., 19:55-61.
- Olesen, K., Felding, T., Gjermansen, C., Hansen, J. 2002.** The dynamics of the *Saccharomyces carlsbergensis* brewing yeast transcriptome during a production-scale lager beer fermentation, Fems Yeast Research "Article in press" 1511:1-11.
- Olsen, M., Möller, T., Akerstrand, K. 1993.** Ochratoxin A: Occurrence and intake by Swedish population. Proceedings of the UK Workshop on occurrence and significance of mycotoxins, University of London, 21-23 April 1993, edited Scudamore, K.A (Slough: Central Science Laboratory, MAFF) pp, 96-100.
- Özkaya, H., Kahveci, B. 1989.** Önemli depo fungusları ve depolanmış hububatların biyokimyasal fonksiyonel ve kalite özellikleri üzerine etkileri. Gıda, 14:275-279.
- Özkaya, Ş., Elden, E., Başaran, A., Avcı, B., Hızlı, Ş. 1995.** Mikotoksinler, İl Kontrol Laboratuvarı Mikotoksin Bölümü Seminer Notları, Ankara.
- Patterson, D.S.P., Roberts, B.A., Shereeve, B.J., Wrathall, A.E., Gitter, M. 1977.** Aflatoxin, ochratoxin and zearalenone in animal feedstuffs: some clinical and experimental observations. Ibid, 31: 643-649.
- Pavlovic, M., Plestina, R., Krogh, P. 1979.** Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area Balkan (Endemic) nephropaty, Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica, 87: 243-246.

- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M., 1999.** Toxic effects of mycotoxins in humans. Bulletin of the Health Organization, 77:754-766.
- Pestka, J.J. 1988.** Enhanced surveillance of food borne mycotoxins by immunochemical assay. J. Assoc. of Anal. Chem. 71:1075-1081.
- Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, Y., Castegnaro, M. 1988.** Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria, Food Addit. Contam., 5:299-301.
- Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., 1991a.** Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria, IARC Scientific Pub. 115:135-137.
- Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., 1991b.** Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chernozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 135-137.
- Petzinger, E., Ziegler, K. 2000.** Ochratoxin A from a toxicological perspective. J. Vet. Pharmacol. Therap. 23, 91-98.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 1985.** Fungi and Food Spoilage. Academic Press, pp. 413 (Alınmıştır: Topal, 1993).
- Pitt, J.I. 1987.** *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. Appl. Environ. Microbiol. 53:266-269.
- Roth, V.L., Frank, H.K., Kormann, K. 1990.** Giftpilze Pilzgifte. Schimmelpilze Mykotoxine. Ecomed Verlagsgesellschaft GmbH.
- Schwarz, P.B., Casper, H.H., Beattie, S. 1995.** Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. J. Am. Soc. Brew. Chem. 53:121-127.

- Scott, D.B., 1965.** Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. *Mycopathology Mycolo. Applied* 25:213-222.
- Scott, P.M., Van Walbeek, W., Kennedy, B., Anyeti, D. 1972.** Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *Agr. Food Chem.* 20:1103-1109.
- Scott, P.M., 1993.** Mycotoxins. *J. Assoc. Of. Anal. Chemistry.* 76: 112-119.
- Scott, P.M., Kanhere, S.R., Lawrence, G.A., Daley, E.F., Farber, J.M. 1995.** Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisin B₁ and B₂, *Food Addit. Contam.*, 12:31-40.
- Scott, P.M., Kanhere, S.R. 1995.** Determination of ochratoxin A in beer, *Food Additives and Contaminants*, 12:591-598.
- Scott, P.M. 1996.** Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J. AOAC Int.*, 79:875-882.
- Scott, P.M. 1998.** Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins, *Revue de Medicine Veterinaire*, 149: 543-548.
- Scudamore, K.A., Patel, S., Breeze, W. 1999.** Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A. *Food Addit. and Contam.* 16:281-290.
- Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W., Goulden, M.L., Vandegraft, E. 1970.** Survey of corn for aflatoxin, zearalenone and ochratoxin. *Cereal Chem.* 47:700-707.
- Sibanda, L., De Saeger, S., Bauters, T.G.M., Nelis, H.J., Peteghem, C.V. 2001.** Development of a flow-through enzyme immunoassay and application in screening green coffee samples for ochratoxin A with confirmation by high-performance liquid chromatography, *J. Food Protect.*, 64:1597-1602.

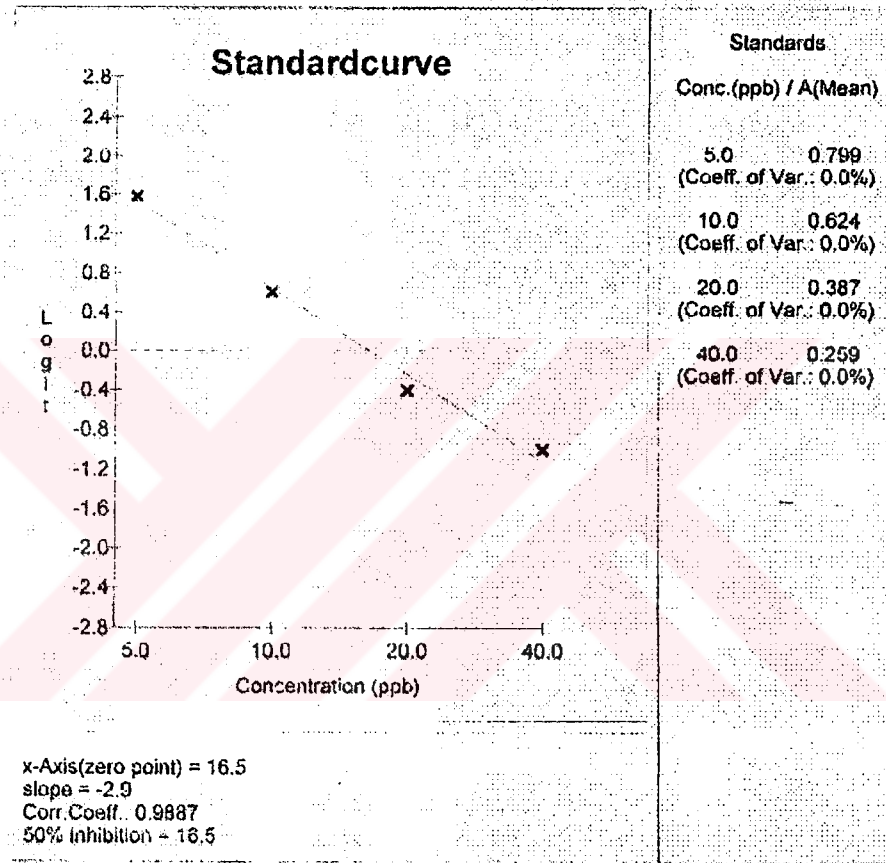
- Skaug, M.A. 1999.** Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. Food Addit. Contam., 16:75-78.
- Sokolowski, M. 1983.** Mycotoxin content of compound feeds and their components on the basis of personal observations. Weterynaryjna. 39: 294-296.
- Soleas, G.J., Yan, J., Goldberg, D.M. 2001.** Assay of ochratoxin A in wine and beer by high pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection, J. Agric. and Food Chemistry, 49: 2733-2740.
- Soysal, İ. 1992.** Biometrinin Temel Prensipleri, T.Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No:95, Tekirdağ.
- Steyn, P.S., 1984.** Ochratoxins and related dihydroisocoumarins. In: "Mycotoxins, production, isolation, separation and purification. Ed. Betina, V. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, pp. 183-216
- Syrett, R. 1979.** Moulds and mycotoxins in animal foodstuffs-reports of Adas microbiologists. ADAS Regional Microbiology Lab., Newcastle on tyne, U.K., Proceedins of a third meeting on mycotoxins in animal disease. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Pinner, U.K: 4-7.
- Şener, S., Yıldırım, M. 2000.** Veteriner Toksikoloji, Teknik Yayıncılık, İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, İstanbul.
- Tamova, S. 1977.** Stability of ochratoxin in foods. (Bulgarian)., Khigiena; Zdraveopazvane, 20: 266-270,
- Tanchev, Y., Dorossiev, D. 1991.** The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later. In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 21-28.

- Taydaş, E.E. 1993.** Kırmızı Biberlerde Aflatoksin ve Okratoksin Oluşumu Üzerine Araştırmalar, H.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Yüksek Mühendislik Tezi, Ankara.
- Thelman, A., Weber, W. 1997.** Determination of ochratoxin A in cereals, malt and beer after accumulation and separation on immunoaffinity columns and following high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 93:1-3.
- Thirumala-Devi, K., Mayo, M.A., Reddy, G., Reddy, D.V.R. (2002)** Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Indian Poultry Feeds, J. Food Protect. 65: 1338-1340.
- Thuvander, A., Paulsen J.E., Axberd, K., Johansson, N., Vidnes, A., Enghardt-Barbieri, H., Trygg, K., Lund-Larsen, K., Jahrl, S., Widenfalk, A., Bosnes, V., Alexander, J., Hult, K., Olsen, M. (2001)** Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. Food Chemical Toxicol., 39:1145-1151.
- Topal, Ş. 1985.** Küflerin gıda ve yem maddelerinden izolasyonu: Gıdaların küfleri ve mikotoksin projesi, Genel Bilgiler ve Laboratuvar Çalışması Yöntemleri, TÜBİTAK-MAE, Bes. ve Gıda Tek. Böl. Gebze, Kocaeli.
- Topal, Ş. 1993.** Gıdalarda Küf Kontaminasyon Riskleri ve Önlemleri, Gıda Sanayinde Mikrobiyoloji ve Uygulamaları. TÜBİTAK-MAM, Gebze, KOCAELİ.
- Trelea, I.C., Titica, M., Landaud, S., Latrille, E., Corrieu, G., Cheruy, A., 2001.** Predictive modelling of brewing fermentation: from knowledge-based to black-box models, Mathematics and computers in simulation, 56: 405-424.
- Tunail, N. 2000.** Mikrobiyel enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.

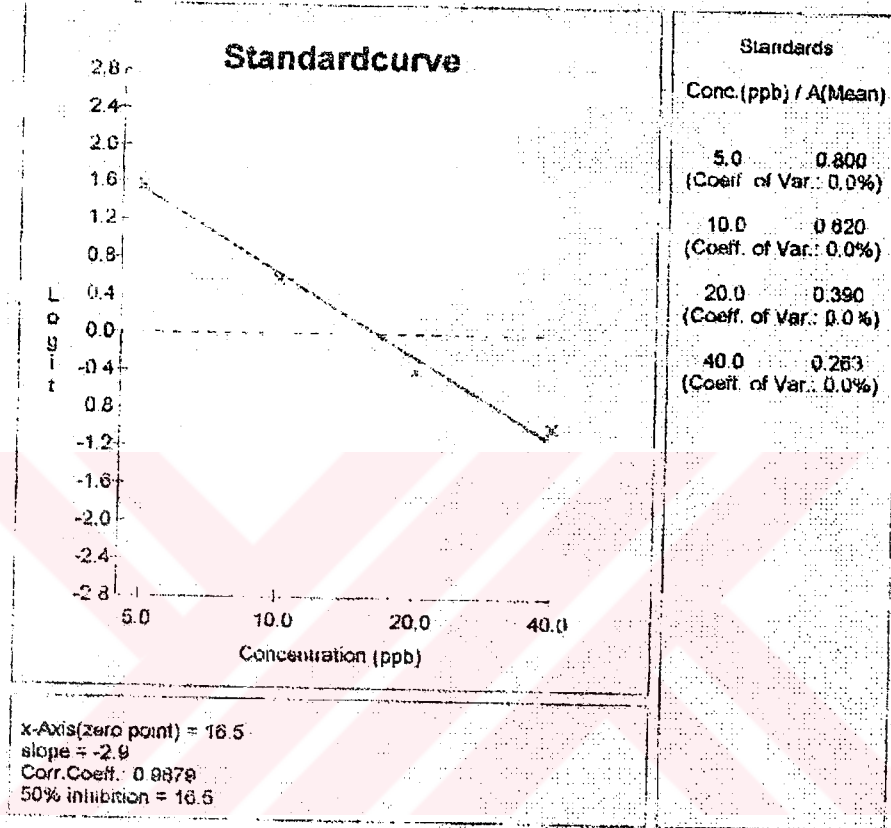
- Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Teren, J., Kozakiewicz, Z., 1996.** Ochratoxin production by *Aspergillus* Species, Appl. Environ. Microbiol., 12: 4461-4464
- Van Egmond, H.P. 1991.** Worlwide regulations for ochratoxin A., In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary, Tract Tumours, Ed. Castegnaro, M., Plestina, P., Dirtemier, G., Chemozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 331-336.
- Vesela, D., Venely, D., Jelinek, S., Kusak, V. 1978.** The finding of ochratoxin A in fodder barley. Veterinarni Medicina, 23: 431-436.
- Visconti, A. 2000.** Mycotoxicology. Newsletter 1/2000. Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species., Appl. Environ. Microbiol. 62: 4461-4464.
- Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G. 2000.** Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography, J. Chromatography A, 888:321-326.
- Weddeling, K., Bassler, H.M.S., Doerk, H., Baron, G. 1994.** Orientated teste for the application of the enzyme immunological process for evidencing deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenon in brewing, Monatsschrift für Brauwissenschaft, 47:94-98.
- Wolf, J. 2000.** Ochratoxin in cereals and cereal products. Archiv für Lebensmittelhyg., 51: 81-88.
- Wolf-Hall, C.E., Schwarz, P.B. 2002.** Mycotoxins and fermentation-Beer production, Mycotoxins and Food Safety Advances in Experimental Medicine and Biology, 504:217-226.
- Xiao, H., Marquardt, R.R., Abramson, D., Frohlich, A.A. 1996.** Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*, Appl. Environ. Microbiol., 62: 648-655.

- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashiwara, T., Yoshida, M., Yasui, T., Nakanishi, K. 1995. Rapid fermentation of beer using an immobilized yeast multistage bioreactor system control of minor products of carbohydrate-metabolism, Appl. Biochemistry and Biotechnol. 53:261-276.**
- Zimmerli, B., Dick, R. 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. Food Addit. Contam., 13:655-668.**





Şekil 1. Analizlere ait standart kurve örneği



Şekil 2. Analizlere ait standart kurve örnekleri

Ek 2 Çizelge 1. Fermentasyon süresi boyunca örneklerdeki değişikliklerin korelasyon ilişkileri

Asitlik						
% Şeker	-0,964**					
% Alkol	0,961**	-0,996**				
PH	-0,945**	0,946**	-0,942**			
Brix (KMI)	-0,963**	0,994**	-0,993**	0,929**		
Maya sayısı	0,323**	-0,135	0,143	-0,385**	-0,124	
OTA	-0,162	0,117	-0,147	0,106	0,120	-0,150
	Asitlik	% Şeker	% Alkol	pH	Brix (KMI)	Maya sayısı
						OTA

** p<0,01 düzeyinde önemli

TEŞEKKÜR

Bu araştırmada benden hiçbir yardımını esirgemeyen ve bana her zaman her konuda destek olup yol gösteren Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet DEMİRCİ'ye, araştırmayı tavsiye eden ve her zaman yardımlarını gördüğüm bölüm hocalarımızdan Sayın Doç.Dr. Muhammet ARICI'ya, tezin yürütülmesine katkı sağlayan Doç.Dr. Nuray ÖZER'e örneklerin toplanmasında yardımlarını gördüğüm Bahri Dağdaş Milletlerarası Kışlık Hububat Araştırma Merkezinden Ziraat Yüksek Mühendisi Eray TULUKÇU'ya ve Efes Pilsen Çumra Malt Sanayiinden Dr. Ahmet ERGÜN'e, Efes Pilsen Lüleburgaz Fabrikası Müdürlüğüne ve Tekel Yozgat Bira Fabrikası Müdürlüğüne, alkol analizlerin yapılmasında yardımcıları gördüğüm Tekirdağ Tekel İçki Fabrikası Müdürlüğüne ve laboratuvar çalışanlarına, labortauvar imkanlarını hiçbir zaman esirgemeyen Tarım Bakanlığı Tekirdağ İl Kontrol Laboratuvarı Müdürü Ahmet KOCABAŞ'a ve Bağcılık Araştırma Müdürlüğünden Gıda Yüksek Mühendisi Fatih KARA'ya, İstatistik hesapların yapılmasında yardımlarını gördüğüm Tarım Makinaları Bölümünden Uzman Habib KGCABIYIK'a, araştırmamı maddi olarak destekleyen **Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna** ve her zaman manevi desteğini yanında hissettiğim anneme, babama ve sevgili eşime teşekkürü bir borç bilirim.

Tuncay GÜMÜŞ
TEKİRDAĞ, 2002

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Konya’da doğdum. İlk, orta ve lise tahsilimi Konya’da tamamladım. 1990 yılında Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi bölümünü kazandım. 1994 yılında mezun olduktan sonra, 1995 yılında Gıda Mühendisliği bölümünde yüksek lisansa ve Araştırma görevlisi olarak göreve başladım. 1997 yılında yüksek lisansımı tamamlayarak, aynı yıl Doktora başladım. Halen aynı bölümde Araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım. Evliyim.

Tuncay GÜMÜŞ

