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

KIRMIZIBİBERLERDE AFLATOKSİN ÜRETİMİNİN TESPİTİ VE KONTROLÜ İÇİN AFLATOKSİJENİK FUNGUSLARIN FARKLI SICAKLIK, SU AKTİVİTESİ VE DEPOLAMA SÜRESİNE BAĞLI OLARAK GELİŞİMLERİNİN GERÇEK ZAMANLI-POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ İLE İZLENMESİ

Hazırlayan
Nurdan YAPAR

Danışman
Doç. Dr. Zülal KESMEN

Doktora Tezi

Ocak 2015
KAYSERİ

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

KIRMIZIBİBERLERDE AFLATOKSİN ÜRETİMİNİN TESPİTİ VE KONTROLÜ İÇİN AFLATOKSİJENİK FUNGUSLARIN FARKLI SICAKLIK, SU AKTİVİTESİ VE DEPOLAMA SÜRESİNE BAĞLI OLARAK GELİŞİMLERİNİN GERÇEK ZAMANLI-POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ İLE İZLENMESİ

Hazırlayan
Nurdan YAPAR

Danışman
Doç. Dr. Zülal KESMEN

Doktora Tezi

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FBT-2013-4359 kodu ile desteklenmiştir.

Ocak 2015
KAYSERİ

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Nurdan YAPAR

"Kırmızıbiberlerde Aflatoksin Üretiminin Tespiti Ve Kontrolü İçin Aflatoksijenik Fungusların Farklı Sıcaklık, Su Aktivitesi Ve Depolama Süresine Bağlı Olarak Gelişimlerinin Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniği İle İzlenmesi" adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan	Danışman
Nurdan YAPAR	Doç. Dr. Zülal KESMEN

Gıda Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Mahmut DOĞAN

Doç. Dr. Zülal KESMEN danışmanlığında Nurdan YAPAR tarafından hazırlanan "**Kırmızıbiberlerde Aflatoksin Üretiminin Tespiti Ve Kontrolü İçin Aflatoksijenik Fungusların Farklı Sıcaklık, Su Aktivitesi Ve Depolama Süresine Bağlı Olarak Gelişimlerinin Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniği İle İzlenmesi**" adlı bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.... /…. / ……

JÜRİ:

Danışman	:Doç. Dr. Zülal KESMEN	…….
Üye	:…….	…….
Üye	:…….	…….
Üye	:…….	…….
Üye	:…….	…….

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……...… tarih ve ……..…… sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.... /…. / ……

Prof. Dr. Kâzım KEŞLİOĞLU

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yön veren çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Zülal KESMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü öğrenimimi devam ettirmemde önemli payı olan ve çalışmalarımı değerli fikirleriyle ve motive ederek destekleyen çok değerli hocam Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ'a çok teşekkür ederim. Matematiksel modelleme ve istatistik çalışmalarındaki yardımlarıyla bu çalışmaya büyük katkı sağlayan Doç. Dr. Banu SOYLU'ya, tüm laboratuvar çalışması sürecinde desteklerini ve emeklerini esirgemeyen Uzm. Ahmet Evren YETİMAN'a, Öğr. Gör. Ayten GÜLLÜCE'ye ve Arş. Gör. Hakiye ARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışmaya, tez projesi (FDK-2013-4359) kapsamında maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi (113O832) kapsamında maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na teşekkür ederim.

Ayrıca, uzun ve yoğun tez çalışması döneminde anlayış ve desteklerini gördüğüm Kurum Müdürüm Fatih ARSLAN'a, çalışma arkadaşlarım Hülya SARAYLI'ya, Fikret TÜRKMEN'e, Şenay KARSLIOĞLU'na, Derya ÇETİN'e ve tüm Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü personeline teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, her zaman olduğu gibi bu çalışma boyunca da büyük bir hoşgörü, sabır ve özveri ile yanımda olan annem Semiha YAPAR'a minnettarlığımı belirterek sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nurdan YAPAR

Kayseri, Ocak 2015

KIRMIZIBİBERLERDE AFLATOKSİN ÜRETİMİNİN TESPİTİ VE KONTROLÜ İÇİN AFLATOKSİJENİK FUNGUSLARIN FARKLI SICAKLIK, SU AKTİVİTESİ VE DEPOLAMA SÜRESİNE BAĞLI OLARAK GELİŞİMLERİNİN GERÇEK ZAMANLI-POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ İLE İZLENMESİ

Nurdan YAPAR
Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi, Ocak 2015
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Zülal KESMEN

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, farklı su aktivitesi ve sıcaklık koşullarında depolanan kırmızıbiberlerde, aflatoksijenik Aspergillus flavus'un aflatoksin üretimi ile aflatoksin biyosentez metabolik yolunda rol alan aflR, nor-1 ve pksA genlerinin ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi tespit etmektir. Çalışmada, kırmızıbiber numunelerinin su aktivitesi değerleri 4 farklı seviyeye (0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95) ayarlandıktan sonra, NRRL 3357 A. flavus suşu ile kontamine edilmiş ve 4 farklı sıcaklıkta (5, 15, 25 ve 35°C) toplam 20 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Kırmızıbiberlerden belli periyotlarla (0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 ve 20. günler) alınan numunelerde, kültürel yöntemle küf sayıları belirlenmiş ve kromatografik yöntemle aflatoksin tayini yapılmıştır. Ayrıca, kırmızıbiber numunelerinden RNA ekstraksiyonu yapılarak ters transkripsiyon gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile *A. flavus*'un aflatoksin biyosentezinde görev alan düzenleyici *aflR* geni ile yapısal *nor-1* ve *pksA* genlerinin ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir.

Çalışma bulguları, 0.80 ve 0.85 a_w değerlerinde depolanan kırmızıbiberlerin küf sayılarının, depolama boyunca, 3. günden sonra test edilen tüm sıcaklıklar için düştüğünü ve en düşük küf sayılarının sırasıyla 0.80 a_w-25°C ve 0.80 a_w-35°C koşullarında depolanan numunelerde depolamanın 20. gününde olduğunu göstermiştir. 0.95 a_w-25°C ve 0.95 a_w-35°C koşullarının ise, çalışma kapsamındaki diğer koşullara kıyasla *A. flavus*'un gelişimi için en uygun koşullar olduğu ortaya konmuştur. Aflatoksin B_1 (AFB_1) analizi sonuçlarından, kontamine kırmızıbiberlerde tüm a_w

seviyelerinde artan sıcaklık ile birlikte AFB_1 miktarının da arttığı gözlenmiştir. Denemeye alınan depolama koşulları içerisinde en düşük AFB_1 üretimi, 0.80 a_w-5°C koşullarında depolanan kırmızıbiberlerde tespit edilmiştir. Çalışmada en yüksek AFB_1 değeri (61.56 ppb) ise, 0.95 a_w-35°C'de 15. günde kaydedilmiş olup bunu 0.95 a_w-25°C'de 15 gündeki AFB_1 miktarı (57.21 ppb) izlemiştir. Ayrıca, *A. flavus*'un AFB_1 üretimi üzerine, su aktivitesi, sıcaklık, zaman, *aflR*, *nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının etkilerini ortaya koymak ve kontamine kırmızıbiberlerde AFB_1 miktarını tahmin edebilmek üzere 8 adet matematiksel model oluşturulmuştur. Modellerin uygunluğu, düzeltilmiş determinasyon katsayıları (R^2_{adj}) ve artıkların normal olasılık dağılım grafikleri ile değerlendirilmiştir. Buna göre, 25°C'de depolanan kırmızıbiberler için elde edilen model (R^2_{adj}= %94.68), AFB_1 üretimi ile gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi en iyi açıklayan model olmuştur. Bu modele göre, 25°C'de depolanan kırmızıbiberlerde *A. flavus*'un AFB_1 üretimi üzerine su aktivitesi, zaman ve *pksA* gen ekspresyonunun etkileri oldukça önemli ($p<0.01$), *nor-1* gen ekspresyonunun etkisi $p<0.05$ düzeyinde önemli bulunurken, *aflR* gen ekspresyonunun etkisi önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada kırmızıbiberlerde su aktivitesi, sıcaklık ve zamana bağlı olarak *aflR, nor-1* ve *pksA* gen ekspresyon düzeyleri ile aflatoksijenik *A. flavus*'un AFB_1 üretimi arasındaki ilişki yanıt yüzey metodu ile oluşturulan bir model ile açıklanmıştır. Ancak, aflatoksin üretimi ile biyosentez metabolik yolundaki genler arasındaki ilişkinin daha kapsamlı olarak ortaya konulabilmesi için, bundan sonraki araştırmalarda, bu çalışmada test edilen genlerin (*aflR, nor-1* ve *pksA)* dışındaki diğer genlerin de ekspresyon düzeylerinin incelenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kırmızıbiber, *Aspergillus flavus*, aflatoksin, gen ekspresyonu, sıcaklık, su aktivitesi, zaman.

MONITORING OF AFLATOXIGENIC FUNGUS DEPENDING ON DIFFERENT TEMPERATURE, WATER ACTIVITY AND STORAGE TIME BY THE METHOD BASED ON REAL TIME- POLYMERASE CHAIN REACTION IN ORDER FOR DETERMINING AND CONTROLLING AFLATOXIN PRODUCTION IN RED PEPPER

Nurdan YAPAR
Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
Ph.D. Thesis, January 2015
Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Zulal KESMEN

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the relationship between the aflatoxin production of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and expression levels of aflatoxin biosynthetic metabolic pathway genes (*aflR, nor-1* and *pksA*) in red pepper stored under different water activities (a_w) and temperature conditions. First, water activities of red pepper samples were adjusted to four levels (0.80, 0.85, 0.90 and 0.95 a_w), samples were inoculated with NRRL 3357 *A. flavus* strain and incubated at 5, 15, 25 and 35°C for 20 days. Cultural mould growth and chromatographic aflatoxin analysis were carried out at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 and 20th days of incubation. Total RNA was also extracted from red pepper samples and expression levels of the regulatory gene *aflR* and two structural genes *nor-1* and *pksA* of the aflatoxin biosynthetic pathway were assayed by the reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

According to our results, mould counts of samples at 0.80 and 0.85 a_w decreased starting from the third day of storage for all tested temperatures and the lowest mould counts were obtained at 0.80 a_w-25°C and 0.80 a_w-35°C conditions, respectively, on the 20th day of storage. It was identified that 0.95 a_w-25°C and 0.95 a_w-35°C were the most appropriate conditions in comparison with others for growth of *A. flavus*. According to aflatoxin B_1 (AFB_1) analysis results, AFB_1 contents of samples increased with the increment of temperature for all a_w levels. The lowest AFB_1 production was observed under 0.80 a_w-5°C conditions in the experiment. The highest AFB_1 amount (61.56 ppb) was detected at 0.95 a_w-35°C on 15th day, and the second highest AFB_1 amount was

observed at 0.95 a_w-25°C on 15th day (57.21 ppb). Furthermore, eight mathematical models were developed to evaluate the effects of a_w, temperature, time, genes (*aflR*, *nor-1* ve *pksA*) expression on AFB_1 production of *A. flavus* and to predict AFB_1 amounts of contaminated red pepper. The fitness of models was assessed via adjusted coefficients of determination (R^2_{adj}) and normal probability plots of residuals. The model developed for red pepper stored at 25°C had the highest R^2_{adj} (= 94.68%) value indicating well explanation of the relationship between AFB_1 production and gene expression levels. According the model, it was found that the effects of a_w, temperature and *pksA* gene expression were very significant ($p<0.01$), the effect of *nor-1* gene expression was significant, while the *aflR* gene expression was insignificant in explaining of the AFB_1 occurence in contaminated red pepper stored at 25°C.

Consequently, the growth of aflatoxigenic *A. flavus*, amounts of AFB_1, gene expression levels of *aflR, nor-1* and *pksA* depending on the water activity, temperature and time were monitored in red peppers and AFB_1 production was modelled with response surface methodology for the first time in this study. Nevertheless, it is thought that it would be useful to examine expression levels of different genes involved in metabolic pathway in order to reveal the relationship between the aflatoxin biosynthetic pathway genes and production of aflatoxin comprehensively.

Keywords: Red pepper, *Aspergillus flavus*, aflatoxin, gene expression, temperature, water activity, time.

İÇİNDEKİLER

KIRMIZIBİBERLERDE AFLATOKSİN ÜRETİMİNİN TESPİTİ VE KONTROLÜ İÇİN AFLATOKSİJENİK FUNGUSLARIN FARKLI SICAKLIK, SU AKTİVİTESİ VE DEPOLAMA SÜRESİNE BAĞLI OLARAK GELİŞİMLERİNİN GERÇEK ZAMANLI-POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ İLE İZLENMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK. i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ii
KABUL VE ONAY iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
KISALTMALAR VE SİMGELER xiii
TABLOLAR LİSTESİ xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ xviii

GİRİŞ 1

1. BÖLÜM
GENEL BİLGİLER

1.1. Kırmızıbiber 3
1.2. Toksijenik Küfler ve Mikotoksinler 7
1.3. Aflatoksinler 11
1.4. *Aspergillus flavus* 16
1.5. Aflatoksin Biyosentez Mekanizması 20
1.6. Aflatoksin Tespit Yöntemleri 26
1.7. Aflatoksijenik Küflerin ve Potansiyel Aflatoksin Oluşumunun Tespitinde Moleküler Yaklaşımlar 29
1.8. Gıdalarda Aflatoksin Seviyesi İçin Yasal Düzenlemeler 32
1.9. Kırmızıbiberlerde Toksijenik Küf Kontaminasyonu ve Aflatoksin Sorunu 34
1.10. Toksijenik Küf ve Mikotoksin Oluşumunun Matematiksel Modelleme İle İfade Edilmesi 38

2. BÖLÜM
MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Materyal 43
2.1.1. Kırmızıbiber 43
2.1.2. Fungal Suşlar 43
2.2. Yöntem 43
2.2.1. Kırmızıbiber Numunelerinin Ön Hazırlığı 43
2.2.2. Kırmızıbiber Numunelerinin Su Aktivitelerinin Ayarlanması 44
2.2.3. Kırmızıbiber Numunelerinin Depolanma Ortamları İçin Gliserol:Su Karışımlarının Hazırlanması 44
2.2.4. Fungal Suşların Geliştirilmesi 44
2.2.5. Fungal Spor Süspansiyonunun Hazırlanması ve Fungal Spor Sayımı 44
2.2.6. Kırmızıbiberlere Fungal Spor Süspansiyonunun İnokülasyonu ve Depolanması 46
2.2.7. Kırmızıbiber Numunelerinde Küf Sayımı 47
2.2.8. Kırmızıbiber NumunelerindeToplam Aflatoksin Tayini 48
2.2.9. Kırmızıbiber Numunelerinden Toplam RNA Ekstraksiyonu 49
2.2.10. GZ-PZR ile RNA Amplifikasyonu 50
2.2.11. Gen Kopya Sayılarının Belirlenmesi 52
2.2.12. Çalışma Verilerinin Modellenmesi ve İstatistiksel Analizler 58

3. BÖLÜM
BULGULAR

3.1. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki Küf Sayım Sonuçları ... 61
3.1.1. Kontamine Kırmızıbiberlerin Küf Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 66
3.1.2. Kontamine Kırmızıbiberlerin Küf Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 70
3.2. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki Aflatoksin Miktarları . 74
3.2.1. Kontamine Kırmızıbiberlerin AFB_1 Miktarlarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 79
3.2.2. Kontamine Kırmızıbiberlerin AFB_1 Miktarlarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 81

3.3. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki *AflR, Nor-1* ve *PksA* Gen Ekspresyon Düzeyleri 83

3.3.1. Kontamine Kırmızıbiberlerin *AflR, Nor-1* ve *PksA* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Olarak Değişimi 92

3.3.2. Kontamine Kırmızıbiberlerin *AflR, Nor-1* ve *PksA* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 98

3.4. Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretiminin Modellenmesi 104

3.4.1. Su Aktivitesi 0.80 Olan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Sıcaklık, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model 104

3.4.2. Su Aktivitesi 0.85 Olan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Sıcaklık, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model 106

3.4.3. Su Aktivitesi 0.90 Olan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Sıcaklık, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model 108

3.4.4. Su Aktivitesi 0.95 Olan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Sıcaklık, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model 110

3.4.5. 5°C'de Depolanan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Su Aktivitesi, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model 114

3.4.6. 15°C'de Depolanan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Su Aktivitesi, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model 116

3.4.7. 25°C'de Depolanan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Su Aktivitesi, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model 118

3.4.8. 35°C'de Depolanan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Su Aktivitesi, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model 120

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki Küf Sayım Sonuçları. 124

4.2. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki AFB_1 Miktarları 128

4.3. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki *AflR, Nor-1* ve *PksA* Gen Ekspresyon Düzeyleri 133

4.4. Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi ile Su Aktivitesi, Sıcaklık, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model 139

4.5. Çalışma Sonunda Elde Edilen Önemli Bulgular ve Tespitler 143

KAYNAKLAR 146

EKLER 161

ÖZGEÇMİŞ 173

KISALTMALAR VE SİMGELER

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AFB_1	: Aflatoksin B_1
AFB_2	: Aflatoksin B_2
AFG1	: Aflatoksin G1
AFG_2	: Aflatoksin G_2
AFM_1	: Aflatoksin M_1
AFM_2	: Aflatoksin M_2
AFPA	: Aspergillus Differentiation Agar
AOAC	: Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (Association of Official Analytical Chemists)
a_w	: Su Aktivitesi
bp	: Baz Çifti
cm^3	: Santimetreküp
CEM	: Corn Extract Medium
CYA	: Czapek Yeast Extract Agar
DAD	: Diyot Grubu Dedektör
DRBC	: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol
EC	: Avrupa Komisyonu
ELISA	: Enzim-İlintili İmmünosorbant Test
FAO	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
F-Değeri	: F Testi Değeri
FLD	: Floresan Dedektör
g	: Gram
GC/MS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi
GZ-PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Dairesi
ICA	: İmmünoafinite Kolon Test
k	: Bağımsız Değişken Sayısı
kob	: Koloni oluşturan birim
KOD	: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması

LB	: Luria-Bertani
LC/MS	: Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi
LD50	: Medyan Öldürücü Doz
MEA	: Malt Extract Agar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm3	: Milimetreküp
mM	: Milimolar
MRD	: Maximum Recovery Diluent
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PBS	: Fosfatlı Tamponlanmış Tuz
P-Değeri	: İstatistiksel Önem Değeri
ppb	: Milyarda bir kısım
PRESS	: Tahminlenmiş Kalıntı Hata Kareler Toplamı
PVP	: Polivinilpirolidon
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R^2_{adj}	: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı
R^2_{pred}	: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı
R^2	: Determinasyon Katsayısı
RIA	: Radyoimmün Test
rpm	: Devir/Dakika
RT-PZR	: Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD	: Serbestlik Derecesi
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
X	: Bağımsız Değişkenler
xg	: Relatif Santrifüj Kuvveti
x_i x_j	: Bağımsız Değişken Değerleri
$\hat{y}$	: Bağımlı Değişken
YEA	: Yeast Extract Agar

YEP	: Yeast Extract Peptone
YES	: Yeast Extract Sucrose
YYM	: Yüzey Yanıt Metodu
β_0	: Model Sabiti
β_i, β_{ii}, β_{ij}	: Değişken Katsayıları
β-ME	: 2-Merkaptoetanol
μA	: Mikroamper
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
ε	: Rassal Hata

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Türkiye'de 1994-2013 Yıllarına Ait Baharatlık Kırmızıbiber Üretim Verileri 5
Tablo 1.2. Türkiye'de 1994-2013 Yıllarına Ait Baharatlık Kırmızıbiber İhracat Verileri 6
Tablo 1.3. Aflatoksinlerin Bazı Fiziksel Özellikleri 13
Tablo 1.4. *Aspergillus* Cinsinin Taksonomik Özeti 17
Tablo 1.5. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne Göre Aflatoksin Limitleri 35
Tablo 2.1. Toplam RNA ile Ters Transkripsiyon GZ-PZR Kurulması 52
Tablo 2.2. Reaksiyon Karışımlarına Uygulanan GZ-PZR Koşulları 52
Tablo 2.3. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Gen Dizilimleri 53
Tablo 2.4. Klonlama İçin Hazırlanan PZR Karışımı 54
Tablo 2.5. Klonlama İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımına Uygulanan PZR Koşulları 54
Tablo 2.6. Klonlama İçin Ligasyon Reaksiyonu Karışımı 55
Tablo 2.7. Klonlanmış Geni İçeren Kompetent Hücre DNA'sı İle Hazırlanan PZR Karışımı 58
Tablo 2.8. Klonlanmış Geni İçeren Kompetent Hücre DNA'sı İle Hazırlanan PZR Karışımına Uygulanan GZ-PZR Koşulları 59
Tablo 3.1. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde AFPA Besiyerinde *A. flavus* Sayım Sonuçları (log kob/g) 63
Tablo 3.2. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde DRBC Besiyerinde *A. flavus* Sayım Sonuçları (log kob/g) 64
Tablo 3.3. Su Aktivitesi, Sıcaklık ve Zamanın Küf Gelişimi Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 65
Tablo 3.4. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde AFB_1 Miktarları 77
Tablo 3.5. Su Aktivitesi, Sıcaklık ve Zamanın AFB_1 Üretimi Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 78
Tablo 3.6. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayıları 86

Tablo 3.7. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayıları 87
Tablo 3.8. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayıları 88
Tablo 3.9. Su Aktivitesi, Sıcaklık ve Zamanın *AflR* Gen Ekspresyonu Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 89
Tablo 3.10. Su Aktivitesi, Sıcaklık ve Zamanın *Nor-1* Gen Ekspresyonu Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 90
Tablo 3.11. Su Aktivitesi, Sıcaklık ve Zamanın *PksA* Gen Ekspresyonu Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 91
Tablo 3.12. 0.80 Sabit a_w'de AFB_1 Üretimi Üzerine Sıcaklık, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 105
Tablo 3.13. 0.85 Sabit a_w'de AFB_1 Üretimi Üzerine Sıcaklık, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 107
Tablo 3.14. 0.90 Sabit a_w'de AFB_1 Üretimi Üzerine Sıcaklık, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 109
Tablo 3.15. 0.95 Sabit a_w'de AFB_1 Üretimi Üzerine Sıcaklık, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 111
Tablo 3.16. 5°C'de AFB_1 Üretimi Üzerine Su Aktivitesi, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 115
Tablo 3.17. 15°C'de AFB_1 Üretimi Üzerine Su Aktivitesi, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 117
Tablo 3.18. 25°C'de AFB_1 Üretimi Üzerine Su Aktivitesi, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 119
Tablo 3.19. 35°C'de AFB_1 Üretimi Üzerine Su Aktivitesi, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları 121

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Kırmızıbiber 3
Şekil 1.2. Gıda Zincirinde Küf Kontaminasyonu ve Mikotoksin Üretimini Etkileyen İç ve Dış Faktörler Arasındaki Etkileşim 10
Şekil 1.3. Bazı Aflatoksinlerin Kimyasal Yapıları 12
Şekil 1.4. *Aspergillus* Türlerinin Genel Mikromorfolojik Yapısı 18
Şekil 1.5. Aflatoksin Biyosentez Metabolik Yolu 21
Şekil 2.1. Thoma Lamı 45
Şekil 2.2. Thoma Lamında Sayım Yapılan Çizgili Alan 45
Şekil 2.3. Thoma Lamındaki Fungal Sporların Mikroskopta 40x Objektifte Görünümü 47
Şekil 2.4. Kırmızıbiberlerin İçine Yerleştirildiği ve İnkübasyona Bırakıldığı Kapaklı Plastik Saklama Kutusu 48
Şekil 3.1. AFPA Besiyerinde *A. flavus* 61
Şekil 3.2. DRBC Besiyerinde *A. flavus* 61
Şekil 3.3. *A. flavus*'un 40x Büyütmeli Objektifle Mikroskobik Görünümü 62
Şekil 3.4. 0.80 a_w'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 66
Şekil 3.5. 0.80 a_w'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 66
Şekil 3.6. 0.85 aw'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 67
Şekil 3.7. 0.85 a_w'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 67
Şekil 3.8. 0.90 aw'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik A. flavus Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 68
Şekil 3.9. 0.90 a_w'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 68
Şekil 3.10. 0.95 a_w'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 69
Şekil 3.11. 0.95 a_w'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 69

Şekil 3.12. 5°C'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 70
Şekil 3.13. 5°C'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 70
Şekil 3.14. 15°C'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 71
Şekil 3.15. 15°C'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 71
Şekil 3.16. 25°C'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 72
Şekil 3.17. 25°C'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 72
Şekil 3.18. 35°C'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 73
Şekil 3.19. 35°C'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 73
Şekil 3.20. AFB_1 Kalibrasyon Grafiği 74
Şekil 3.21. AFB_2 Kalibrasyon Grafiği 74
Şekil 3.22. AFG_1 Kalibrasyon Grafiği 75
Şekil 3.23. AFG_2 Kalibrasyon Grafiği 75
Şekil 3.24. 0.80 a_w'de AFB_1'in Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi..... 79
Şekil 3.25. 0.85 a_w'de AFB_1'in Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi..... 79
Şekil 3.26. 0.90 a_w'de AFB_1'in Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi..... 80
Şekil 3.27. 0.95 a_w'de AFB_1'in Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi..... 80
Şekil 3.28. 5°C'de AFB_1'in Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi..... 81
Şekil 3.29. 15°C'de AFB_1'in Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi..... 81
Şekil 3.30. 25°C'de AFB_1'in Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi..... 82
Şekil 3.31. 35°C'de AFB_1'in Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi..... 82
Şekil 3.32. Log *AflR* Gen Kopya Sayıları İle Cq Değerleri Arasındaki İlişkiyi Gösteren Kuadratik Grafik 84
Şekil 3.33. Log *Nor-1* Gen Kopya Sayıları İle Cq Değerleri Arasındaki İlişkiyi Gösteren Kuadratik Grafik 84

Şekil 3.34. Log *PksA* Gen Kopya Sayıları İle Cq Değerleri Arasındaki İlişkiyi Gösteren Kuadratik Grafik 85
Şekil 3.35. 0.80 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 92
Şekil 3.36. 0.80 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 92
Şekil 3.37. 0.80 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 93
Şekil 3.38. 0.85 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 93
Şekil 3.39. 0.85 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 94
Şekil 3.40. 0.85 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 94
Şekil 3.41. 0.90 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 95
Şekil 3.42. 0.90 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 95
Şekil 3.43. 0.90 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 96
Şekil 3.44. 0.95 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 96
Şekil 3.45. 0.95 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 97
Şekil 3.46. 0.95 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 97
Şekil 3.47. 5°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 98
Şekil 3.48. 5°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 98
Şekil 3.49. 5°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 99

Şekil 3.50. 15°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 99
Şekil 3.51. 15°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 100
Şekil 3.52. 15°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 100
Şekil 3.53. 25°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 101
Şekil 3.54. 25°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 101
Şekil 3.55. 25°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 102
Şekil 3.56. 35°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 102
Şekil 3.57. 35°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 103
Şekil 3.58. 35°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi 103
Şekil 3.59. Sabit Su Aktivitesinde Sıcaklık ve Zamanın AFB_1 Üretimi Üzerine Etkilerini Gösteren Yanıt Yüzey Grafikleri 112
Şekil 3.60. Sabit Su Aktivitesinde Oluşturulan Modeller İçin Artıkların Normal Olasılık Dağılım Grafikleri 113
Şekil 3.61. Sabit Sıcaklıkta Su Aktivitesi ve Zamanın AFB_1 Üretimi Üzerine Etkilerini Gösteren Yanıt Yüzey Grafikleri 122
Şekil 3.62. Sabit Sıcaklıkta Oluşturulan Modeller İçin Artıkların Normal Olasılık Dağılım Grafikleri 123

GİRİŞ

Mikotoksin kelimesi, Yunanca “fungus” anlamına gelen “mykes” ile Latince “zehir” anlamına gelen “toxicum” sözcüklerinin birleşmesinden oluşur. Mikotoksinler, bazı fungusların ikincil metaboliti olarak sentezlenen düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Küfler, tarımsal sistemleri daha çok hasat öncesinde tarlada ya da hasat sonrasında depolama, taşıma ve işleme süreçlerinde kontamine ederler. Dolayısıyla, bu süreçlerde ve koşullar uygun olduğunda, gıdaların mikotoksinlerle kontaminasyonu söz konusudur [Bhat ve ark., 2009].

Mikotoksinler arasında toksik etkisi en fazla olan, *Aspergillus* cinsine ait başlıca *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* türleri tarafından üretilen aflatoksinlerdir. Doğada yaygın olarak bulunan ve sıklıkla topraktan izole edilen *A. flavus* suşlarının yaklaşık %76’sının aflatoksijenik olduğu bilinmektedir. Ancak, aflatoksin üretimi, küfün genetik potansiyeline ve su aktivitesi, sıcaklık, substrat, pH gibi çevresel faktörlere bağlıdır [Tunail, 2000].

Bitkisel ürünlerde yaygın olarak rastlanan aflatoksinin, baharatlar için de büyük risk oluşturduğu bilinmektedir. Bunun başlıca sebepleri, baharatların çoğunlukla yüksek sıcaklık ve neme sahip tropik iklimlerde üretilmeleri, geleneksel işleme teknolojilerine sahip olmaları ve uygun olmayan koşullarda depolanmalarıdır. Baharatlar arasında kırmızıbiberin aflatoksine en hassas ürün olduğunu gösteren pek çok araştırma mevcuttur. Bunun yanı sıra, Türkiye’de kırmızıbiber tarımının önemli bir yere sahip olması, üretim aşamasında yoğun işgücü gerektirdiğinden ülke istihdamına katkı sağlaması, gıda sanayinde girdi olarak kullanılması ve ihracatının yapılması gibi birçok nedenden dolayı, kırmızıbiberlerdeki aflatoksin sorunu, hem ekonomik bir problem hem de insan sağlığını tehdit edici bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır.

Aflatoksijenik *Aspergillus* türleri tarafından aflatoksin biyosentez metabolik yolu, günümüzde tanımlanmıştır. Aflatoksin biyosentezinde 27 enzimatik basamak olduğu ve yaklaşık 30 genin rol aldığı öngörülmüştür. Ancak, biyosentez metabolik yolu ara ürünlerinin, ilgili enzimlerin ve biyodönüşümlerde rol alan genlerin, küfün geliştiği substrat ve çevresel şartlarla etkileşimleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Ülkemizde ve dünyada, aflatoksijenik küfler ve aflatoksinler dahil tüm mikotoksijenik küfler ve metabolitleri ile ilgili hem kültür ortamlarında hem de gıdalarda yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ancak, aflatoksin biyosentez sürecinin ve şartlarının açığa kavuşturulması için, bu konuda daha fazla moleküler çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu düşüncelerle, kırmızıbiberlerde aflatoksin sorununun çözümünde veri teşkil edecek bir araştırma planlanmıştır. Bunun için, farklı su aktivitesi, sıcaklık ve süre faktörlerinin kırmızıbiberlerde *A. flavus*'un gelişimi ve aflatoksin üretimi yanında, 3 aflatoksin metabolik yolu geninin (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyon düzeylerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Sonuçta, kansorejen, teratojen, mutajen ve immün sistemini baskılayıcı gibi birçok ciddi sağlık zararı kanıtlanan aflatoksinlerin kırmızıbiberlerde kontrolü için yararlı bilgiye ulaşılması ve bu alandaki literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Kırmızıbiber

Kırmızıbiber, *Solanaceae* familyasından *Capsicum* cinsine dahil tek yıllık bir kültür bitkisinin sebzelerinin (Şekil 1.1) kurutularak öğütülmesi sonucu elde edilen bir baharattır. Arkeologların bulgularına göre kırmızıbiber, yaklaşık M.Ö. 7500 tarihinden bu yana tüketildiği bilinen ve ilk olarak Meksika yerlileri tarafından kullanıldığı ileri sürülen yenilebilir en eski bitkisel ürünlerdendir. Ana vatanı kabul edilen Amerika'dan Asya, Avrupa ve Afrika'ya yayılmıştır [Duman, 2010]. İlk olarak 16. yüzyılda Osmanlı İmparatorluğu Dönemi'nde Orta Avrupa'dan Anadolu'ya getirildiği bilinmektedir [Şeniz, 1992].

Şekil 1.1. Kırmızıbiber

Kırmızıbiber, genel olarak *Capsicum* cinsi içinde yer alan *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum minimum* Mill olmak üzere üç tür bitkiden elde edilir [Akgül, 1993]. Bu türler içinde en çok yetiştirileni ve en yaygın olanı, *C. annuum* L. türüdür. Ancak, bitki türü içinde, acılık ve renkleri birbirinden oldukça farklı olan çok sayıda çeşit bulunması, çok farklı özelliklerde kırmızıbiber üretimini mümkün kılmaktadır [Ermiş, 1998].

Türkiye'de Güneydoğu, Akdeniz, Ege bölgeleri, başlıca kırmızıbiber tarımı yapılan bölgelerdir. Türkiye üretiminin %76.5'i Güneydoğu, %17.5'i Akdeniz, %6'sı Ege bölgelerinde gerçekleşmektedir [Paksoy ve Uslu, 2006]. Güneydoğu Bölgesi'ndeki üretimin çok büyük bir bölümü, Kahramanmaraş ili merkez, Pazarcık, Türkoğlu, Narlı ilçeleri ile Gaziantep iline bağlı Islahiye ve Nurdağı ilçelerinde yapılmaktadır [Duman ve ark., 2002]. Çok değişik biber çeşitleri yetişebilen Türkiye'de, özellikle Kahramanmaraş, Gaziantep, Şanlıurfa, Kayseri, Bursa ve Bilecik'te yetiştirilenler, toz kırmızıbiber ve pul biber üretiminde değerlendirilmektedir [Doğantan, 1986].

100 g kuru kırmızıbiber, 31.6 g karbonhidrat, 13.8 g protein, 6.2 g yağ, 30.2 g lif, 58.8 mg askorbik asit, 15.3 mg niasin, 4.91 mg karoten, 1.36 mg riboflavin, 0.6 mg tiamin, 2.4 mg potasyum, 0.3 mg fosfor, 0.23 mg demir, 0.2 mg kalsiyum içerir [Beis, 1990].

Kırmızıbiberlere acılığı kapsaisinoit bileşikler vermektedir. Bu bileşiklerden en fazla bulunanı, türe göre %46-77 arasında değişen kapsaisindir. Diğer kapsaisinoit bileşiklerden dihidrokapsaisin %21-40, nordihidrokapsaisin %2-12, diğerleri ise %5'den az düzeyde bulunur. Kırmızıbiberlerin rengini ise, ketokarotenoidlerden başta kapsantin olmak üzere, kapsorubin ve kapsantin 5,6 epoksit; ksantofillerden, β-kriptoksantin, zeaksantin, violaksantin ve kapsolutein; karotenlerden de β-karoten oluşturmaktadır Kırmızıbiberdeki toplam karotenoidlerin %70-80'ini kapsantin ve kapsorubin oluşturmaktadır [Akgül, 1993; Demiray ve Tülek, 2012]. Yapılan çalışmalar, acılık bileşenlerini oluşturan kapsaisinoitlerin, iştah açıcı özellik gösterdiğini ve mutajenite, karsinojenite ve ülsere karşı etkili olduğunu ortaya koymuştur [Kadakal ve ark., 2001]. Aynı zamanda, kırmızıbiberlerin rengini oluşturan karotenoidlerin antioksidan özellikleri, vitamin A aktivitesi göstermeleri ve özellikle son yıllarda bazı karotenoidlerin kanser riskini azalttığı ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği yönündeki araştırma sonuçları, kırmızıbiberlerin insan sağlığı üzerindeki yararlılığını daha da ön plana çıkarmıştır [Özkan ve Cemeroğlu, 1997].

Baharatlık kırmızıbiber üretiminde, bölgeye ve işletmeye bağlı olarak farklı yöntemler ve uygulamalar olmakla birlikte, geleneksel işleme yöntemleri yaygındır. Kırmızıbiber hasatı, Türkiye'de Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Ağustos ayının ikinci yarısından itibaren başlamaktadır. İşçiler tarafından el ile toplanan biberler, çuvallara doldurularak sergi yerlerine taşınmakta ve 5-10 cm kalınlıkta serilerek hava akımında kurumaya

bırakılmaktadırlar. Kuruma, uygun hava şartlarında 10-12 günde gerçekleşmektedir. Ağustos ayı içerisinde birinci hasat dönemi bittikten sonra, genellikle tarla yeniden sulanıp gübrelendikten 15-20 gün sonra, ikinci hasat yapılmaktadır. Biberlerin tamamının olgunlaşması için daha az sulamanın yapıldığı bu dönemde, hasat edilen biberlerin kalitesi, ilk hasat edilen ürünlere göre daha düşük olmaktadır. Kurutulan kırmızıbiberler, değirmenlerde öğütülerek paketlenmektedir [Tıraş, 2003].

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, Türkiye'de baharatlık kırmızıbiber ekiminde ve üretiminde son 20 yılda önemli gelişmeler yaşanmıştır. Tablo 1.1'de yıllara göre kırmızıbiber ekim alanları ve üretim miktarları yer almaktadır [TÜİK, 2014a]. 1994-2003 yılları arasında, kırmızıbiber ekim alanı yaklaşık %70 artış gösterirken, kırmızıbiber üretim miktarı yaklaşık 2.7 katına çıkmıştır. Son 10 yıllık dönemde ise, kırmızıbiber ekim alanı sadece %0.13 oranında artarken, kırmızıbiber üretimi yaklaşık 5 katına çıkmıştır.

Kırmızıbiber, yurdumuz iç pazarında olduğu kadar, dış pazar potansiyeli açısından da ekonomik öneme sahip bir üründür [Paksoy ve Uslu, 2006]. Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Almanya, Fransa, Hollanda, Romanya, Makedonya, İngiltere, Kosova, Irak, Suudi Arabistan, Birleşik Arap Emirlikleri vb. ülkelere kırmızıbiber ihracatı yapılmaktadır [Paksoy ve Uslu, 2006; Yalçın, 2008].

TÜİK verilerine göre, son 20 yıla ait ülkemizin kırmızıbiber ihracat rakamları, Tablo 1.2'de yer almaktadır [TÜİK, 2014b]. Tablo 1.2'den de görüldüğü gibi, Türkiye'nin kırmızıbiber ihracatında yıldan yıla belirgin dalgalanmalar dikkat çekmektedir. 1994 yılından 2012 yılına kadar ihracattaki düşüş ve kararsızlığın başlıca nedeninin, kırmızıbiberlerde yaygın olarak yaşanan aflatoksin sorunu olduğu düşünülmektedir. 1994 yılında, Almanya ve İsviçre'ye ihraç edilen kırmızıbiberlerde yüksek seviyelerde aflatoksin bulunmuştur. Bu durum üzerine, 16.01.1995 tarihinde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nda ilgili kuruluşların katılımıyla bir toplantı yapılmış ve ihraç edilen kırmızıbiberlerde zorunlu olarak aflatoksin kontrolünün yapılmasına karar verilmiştir. Bu tarihten itibaren, ihracat öncesi kırmızıbiberlerde aflatoksin analizi yapılmaktadır.

Tablo 1.1. Türkiye'de 1994-2013 Yıllarına Ait Baharatlık Kırmızıbiber Üretim Verileri (TÜİK, 2014)

Yıl	Alan (Dekar)	Üretim (Ton)
1994	58 810	14 878
1995	57 840	13 887
1996	61 520	14 750
1997	63 200	14 466
1998	61 900	14 333
1999	57 730	16 080
2000	80 940	21 340
2001	90 000	20 000
2002	70 000	30 000
2003	100 000	40 000
2004	71 600	30 000
2005	78 000	45 000
2006	66 960	45 861
2007	71 285	67 213
2008	77 747	60 000
2009	91 372	196 900
2010	104 049	186 272
2011	91 557	162 125
2012	112 677	165 527
2013	112 736	198 636

Tablo 1.2. Türkiye'de 1994-2013 Yıllarına Ait Baharatlık Kırmızıbiber İhracat Verileri (TÜİK, 2014)

Yıl	İhracat Miktarı (kg)	İhracat Girdisi (Dolar)
1994	1 317 044	1 214 080
1995	479 975	564 072
1996	229 381	393 502
1997	210 071	468 475
1998	350 251	546 664
1999	480 450	1 030 962
2000	259 897	564 176
2001	768 018	1 051 392
2002	687 650	840 557
2003	832 374	1 280 402
2004	630 515	1 528 984
2005	519 638	1 128 341
2006	732 498	1 544 940
2007	556 761	1 809 302
2008	566 067	1 859 180
2009	541 679	1 815 851
2010	705 744	2 407 063
2011	736 231	2 534 555
2012	452 013	1 830 369
2013	729 918	2 933 493

1.2. Toksijenik Küfler ve Mikotoksinler

Tüm mikotoksinler, düşük molekül ağırlıklı doğal ürünlerdir. Filamentöz küflerin hifsi yapısı, küflerin yüzeyler üzerinde gelişerek ve katı matrislerin içine nüfuz ederek substrattan etkin bir şekilde yararlanmak üzere yayılmalarını sağlar. Küfler, kompleks makromolekül bileşikleri parçalamak üzere enzimler salgılayabilirler ve gelişimleri ve metabolizmaları için bunları kullanabilirler. Ayrıca, düşük molekül ağırlıklı besinleri absorblayabilirler ve gelişme ve primer metabolizma prosesi ile ilgisi olmayan, nispeten düşük molekül ağırlıklı bileşikler olan ikincil metabolitler üretebilirler. [Feddern ve ark., 2013]. Bunlardan biri de mikotoksinlerdir. Mikotoksinler çoğunlukla, bazı filamentöz küflerin heterosiklik halka yapısında ikincil metabolitleri olarak tanımlanırlar [Alldrick ve ark., 2009; Rocha ve ark., 2014]. İkincil metabolitler, hücre çoğalma sürecinde oluşan ve gelişme için esas teşkil eden proteinler, nükleik asitler, lipitler ve karbonhidratlar gibi primer metabolitlerden farklı olup fungal gelişim ya da

fizyolojide belirgin bir öneme sahip değildirler ve fungusun eksponansiyel gelişme fazının son evresinde oluşurlar. Tüm canlı sistemler için primer metabolizma temelde aynı iken, ikincil metabolizma kompleks ve türe spesifiktir [Maggon ve ark., 1977]. Birincil ve ikincil metabolizma, ayrı ve bağımsız süreçlerdir. Birincil metabolizmanın birbirine bağlı olan katabolik ve biyosentetik aktiviteleri, organizmaların yapısal ve biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Diğer taraftan, ikincil metabolizma, organizmaların fonksiyonlarının sağlıklı ancak, gelişme evrelerinin sonunda bileşikler üretir. Birincil metabolizmanın metabolik yolu, ikincil metabolizmanın öncüllerini temin eder. Dolayısıyla, gelişme fazı (trofofaz) boyunca, ikincil metabolitlerin oluşumu için gerekli enzimler olmadığından bu metabolitler oluşamazlar [Bhatnagar ve ark., 1992]. Klasik bakteriyologlar tarafından kabul edilen tek hücreli canlıların gelişim eğrisi, lag fazı (başlangıç fazı), log fazı (eksponansiyel faz) ve durağan faz olmak üzere başlıca 3 fazdan oluşur. Fakat funguslar, bakteriler için geçerli olan bu gelişim eğrisine birebir uymazlar. Biyoteknoloji alanında çok çeşitli çalışmaları ve yayınları olan bilim adamı John Desmond Bu'Lock, 1965 yılında, filamentöz organizmaların gelişme kinetiklerini tanımlamak için trofofaz ve idiyofaz olarak adlandırdığı 2 temel fazdan söz etmiştir. Trofofaz, yaklaşık olarak bakterilerin eksponansiyel fazına eşdeğer olan ve aynı zamanda kuru ağırlığın arttığı, aktif besin alım süreci olarak tanımlanmıştır. İdiyofaz ise, yaklaşık olarak bakterilerin yavaşlama fazına karşılık gelmektedir. İdiyofaz sürecinde, ortamdaki besin bileşenlerinin tükenmesi ile birlikte mikotoksinler gibi ikincil metabolitlerin üretimi söz konusudur [Kale ve Bennett, 1992]. İkincil metabolizma, sadece aktif gelişme fazı sona erince, her canlı sisteme özgün olan bir gelişme fazında yani idiyofazda başlar. Ancak bu durumu, mutlak olarak tanımlamak mümkün değildir. Çünkü fungal gelişme şartlarının değişmesi ile ikincil metabolitlerin üretimi de değişir. Aynı zamanda, ikincil metabolitler, üreyen organizmaların gelişimi için elzem olmadıkları gibi, bazıları üreyen organizma üzerinde negatif etkiye de sahiptirler [Bhatnagar ve ark., 1992]. Dolayısıyla, bir toksijenik küfün mikotoksin üretimini gerçekleştirmesi için, bu üretimi indükleyen bazı şartların sağlanması gerekir. Mikotoksinlerin biyosentezinin indüksiyonu ile ilgili düzenleyici mekanizmalar komplekstir. İndüksiyon için başka şartlar bulunmakla birlikte, mikotoksin üretiminin genellikle birincil metabolizma için gerekli besinlerin tamamlanması ile idiyofaz sürecinde (küflerin gelişmelerinin yavaşlama evresinin başlangıcında) başladığı kabul edilmektedir [Trail ve ark., 1995].

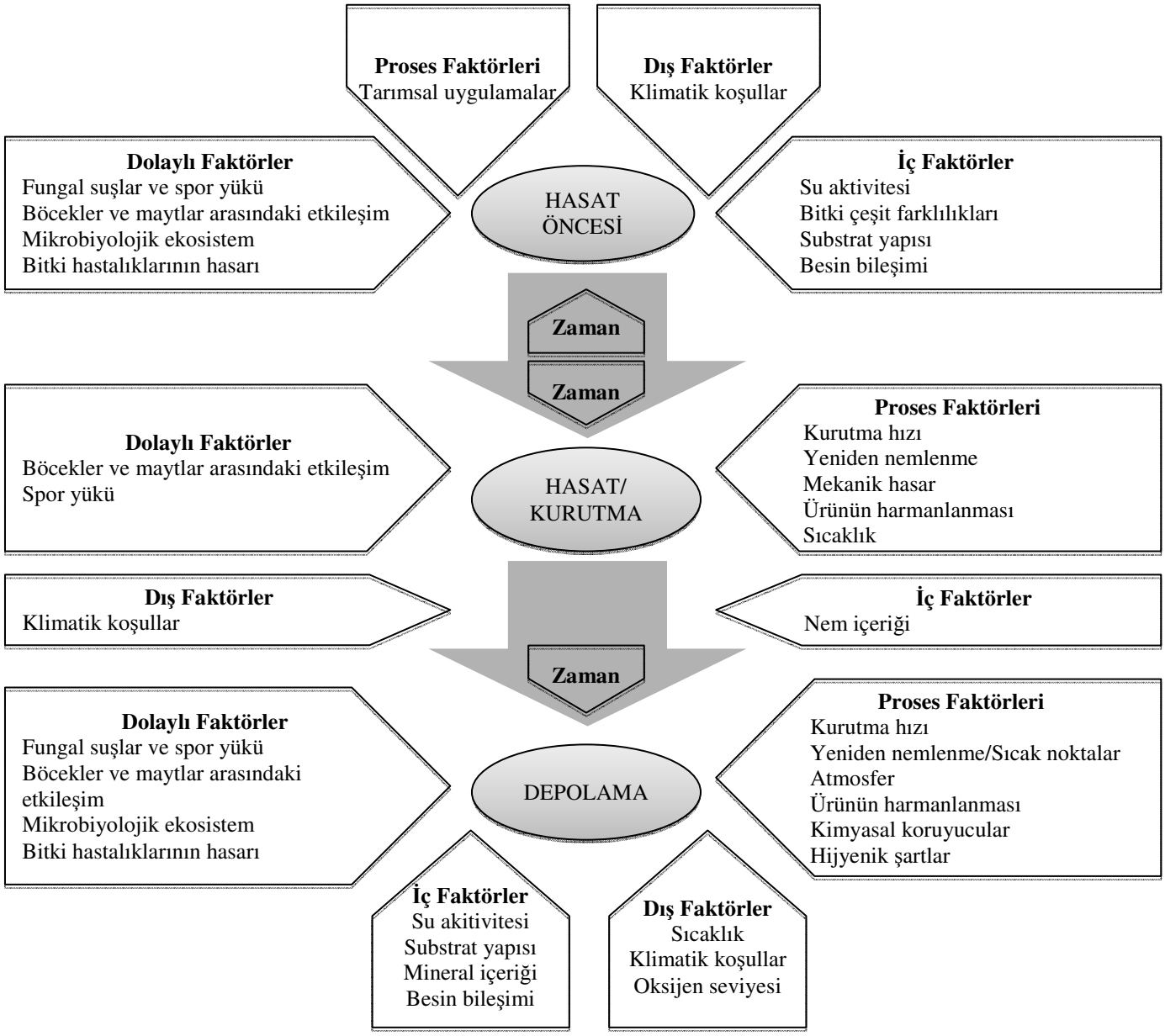
Bazı mikotoksinler, sadece sınırlı sayıda fungal tür tarafından üretilirken, bazı mikotoksinler birkaç fungal cinse ait birçok tür tarafından üretilebilirler [Gqaleni ve ark., 1997]. Ayrıca, toksijenik küfler, bir ya da daha fazla toksik ikincil metabolit üretebildikleri gibi, bir fungal türün tüm suşları toksijenik değildir. Bunun yanında, her toksijenik suşun, her koşulda mikotoksin üretmediği de bilinmektedir [Hussein ve Brasel, 2001].

Tarımsal ürünler, mikotoksinler ile hasat öncesi, hasat sırasında ve optimum olmayan şartlarda üretim, depolama ve taşıma sürecinde kontamine olabilirler. Ürün, tarlada mikotoksin üreticisi küflerle kontamine olduğunda, sıcaklık ve nem içeriği uygun olduğu sürece, hasat ve depolama boyunca, hatta gıda işleme sürecinde fungal gelişme devam eder. Bitkinin genotipi, toprağın tipi, kuruluk, bitki sıklığı, gübreleme seviyesi ve böcek aktivitesi, hasat öncesi kontaminasyon olasılığını belirleyen en önemli etmenlerdir. Ancak, bitki normal enerji kaynağından yoksun kaldığında, yüksek gece sıcaklıkları ve nem yanında, olumsuz havalandırma koşullarıyla da bağlantılı olarak fungal gelişmeye karşı direnç gösteremez ve hasat sonrasında da toksin oluşumu gerçekleşebilir [Reddy ve ark., 2010].

Toksijenik küfler, tarımsal ürünleri farklı dönemlerde kontamine etmekle birlikte, kontamine ettikleri zamanla bağlantılı olarak genellikle iki gruba ayrılırlar. Bunlardan birinci grup küfler, tarlada ürünü kontamine ederler, gelişirler ve toksinlerini de üründe hasat öncesi ürettikleri için “tarla küfü” olarak adlandırılırlar. İkinci grup küfler ise, hasat sonrası üründe problem oluştururlar ve bundan dolayı “depo küfü” olarak bilinirler. Ancak her iki durumda da, küflerin kaynağı tarladır ve bitki konakçısı küfler, fiziksel ve biyolojik etkileşimler ile hasat öncesi ürünü istila ederler, hasat sonrası gelişmek üzere, ürünü besi ortamı olarak kullanırlar ve biyotik (böcekler gibi) ve abiyotik (sıcaklık, nem gibi) faktörler ile yönlendirilirler [Miller, 1995]. Kısacası, sağlıksız hasat uygulamaları, uygun olmayan kurutma, işleme, paketleme, muhafaza ve taşıma şartları, fungal gelişmeyi destekler ve dolayısıyla mikotoksin oluşumu için uygun zemin hazırlar [Bhat ve ark., 2009].

Magan ve ark. (2003), tarımsal ürünlerin hasat öncesi, hasat ve depolama sürecinde küflerle kontaminasyonunu ve mikotoksin üretimini etkileyen faktörleri, iç faktörler, dış faktörler, dolaylı faktörler ve proses faktörleri olmak üzere 4 ana başlık altında

toplamışlar ve bu faktörler arasındaki etkileşimi şematik olarak özetlemişlerdir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Gıda Zincirinde Küf Kontaminasyonu ve Mikotoksin Üretimini Etkileyen İç ve Dış Faktörler Arasındaki Etkileşim [Magan ve ark., 2003]

Mikotoksin kontaminasyonu, ürünün doğrudan toksijenik küflerle teması sonucu olabildiği gibi, toksijenik küf ile daha önceden kontamine olan bir bileşenin gıda maddesi üretiminde kullanılması gibi dolaylı şekilde de olabilmektedir. Doğrudan ya da dolaylı olarak mikotoksinlerle kontamine olmuş gıdalar, sadece gelişmekte olan ülkelerin değil, tüm dünya ülkelerinin sorunudur. [Bhat ve Miller, 1991; Mannon ve

Johnson, 1985]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, dünyada gıda maddelerinin yaklaşık %25'inin farklı şekillerde mikotoksinlerle kontamine olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle, mikotoksinlerin hem insanlar hem de hayvanlar için önemli bir tehlike arzettiği kabul edilmektedir [Alldrick ve ark., 2009].

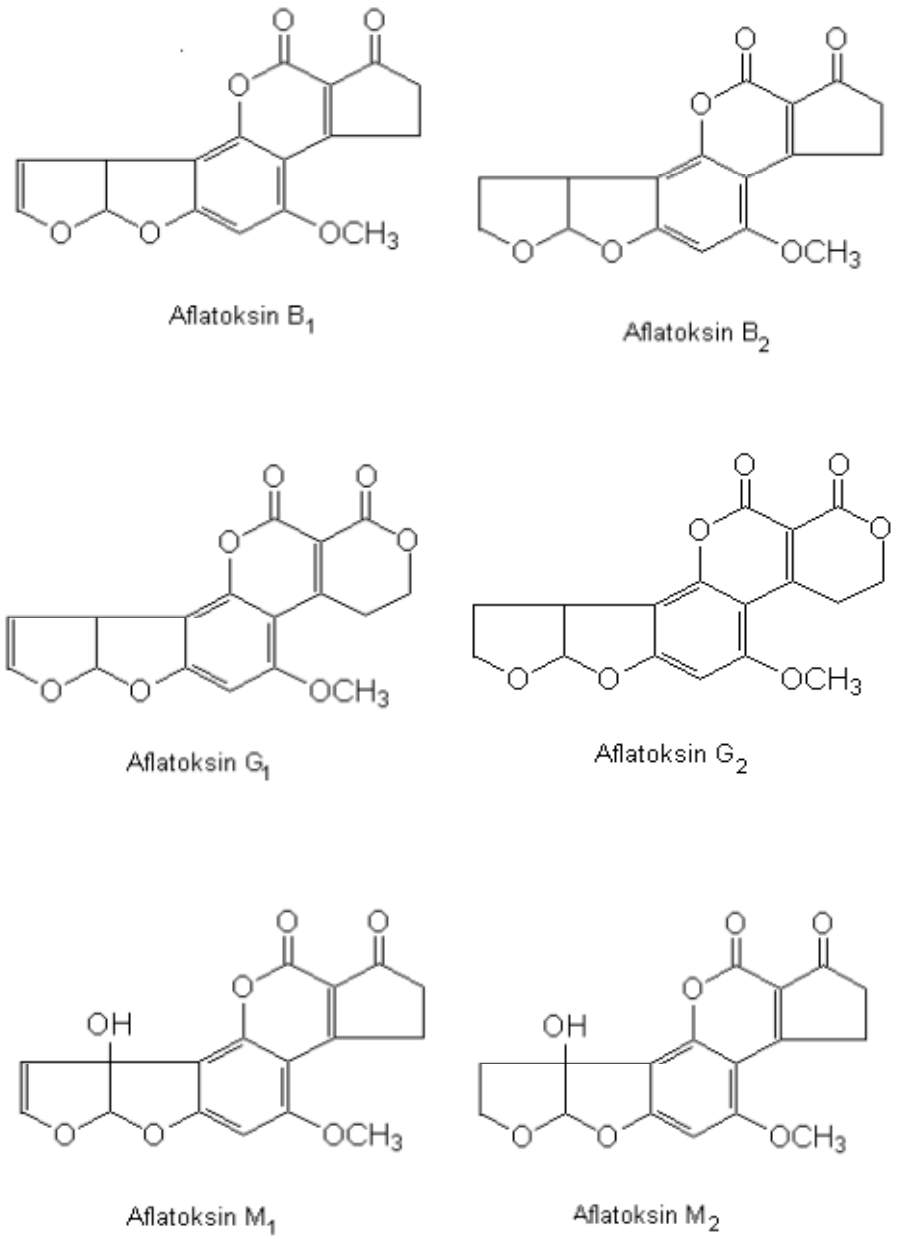
Toksin üreten pek çok küf arasında, *Aspergillus, Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps* ve *Stachybotrys* en önemli mikotoksin üreticileri olarak bilinir ve tanımlanmış 400'den fazla mikotoksin içinde hem ticari etki hem de insan ve hayvan sağlığı riski açısından en önemlileri, aflatoksinler, fumonisinler, okratoksinler, deoksinivalenol, zearalenon ve patulindir. Bunlar arasında en yaygın ve en riskli olanlar ise, aflatoksinlerdir [Reddy ve ark., 2010; Zain, 2011].

1.3. Aflatoksinler

Aflatoksinler, başlıca *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'un bazı suşları tarafından üretilen biyolojik olarak aktif ikincil metabolitlerdir [Trail ve ark., 1995]. Ancak, son çalışmalar, *Aspergillus nomius, Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus bombycis, Aspergillus ochraceoroseus, Aspergillus rambellii* ve diğer bazı *Aspergillus* türlerini de aflatoksin üreticisi olarak tanımlamışlardır [Mishra ve Das, 2003; Varga ve ark., 2003; Cary ve ark., 2009]. Ancak aflatoksin, ilk olarak *A. flavus*'dan izole edildiğinden dolayı, toksinin isimlendirmesi "*A. flavus* toksini" anlamında "A-flatoksin" şeklinde yapılmış ve bu şekilde kullanılmaya devam edilmiştir [Yu ve ark., 2002].

Aflatoksinler, kimyasal olarak difuranokumarin türevleridirler (Şekil 1.3). Bugüne kadar yaklaşık 18 farklı aflatoksin tipi tanımlanmış olmakla birlikte, bu grubun temel bileşenleri, UV ışığı altında verdikleri floresan renge ve ince tabaka kromatografisi ile ayrılmaları sürecindeki nispi hareketliliklerine göre dört büyük gruba ayrılırlar. Mavi renk verenler, aflatoksin B_1 (AFB_1) ve aflatoksin B_2 (AFB_2), yeşil renk verenler aflatoksin G_1 (AFG_1), ve aflatoksin G_2 (AFG_2) olarak adlandırılırlar. AFB_1 ve AFB_2 toksinleri, kumarin yapıdaki lakton halkasına eklenmiş siklopentanon halkası, AFG_1 ve AFG_2 toksinleri ise ek bir lakton halkası içermektedirler. Aflatoksin M_1 (AFM_1) ve aflatoksin M_2 (AFM_2) ise, AFB_1 ve AFB_2'nin hidroksile olmuş metabolitleridirler. Önceden AFB_1 ve AFB_2 ile kontamine diyete maruz kalan laktasyon dönemindeki hayvanlardan ve kadınlardan salgılanan sütlerde bulunurlar. Ayrıca, böbrek ve

karaciğerde de, AFM_1 ve AFM_2'ye rastlanır. Ancak, bunlardan en sıklıkla ve en çok üretilen aflatoksin türleri, AFB_1 ve AFG_1 olup AFB_1'in toksik etkisi, diğerlerine göre daha fazladır [Mishra ve Das, 2003; Mulunda ve Mike, 2014]. Çalışmalar, AFB_1 ile kontamine yem alımından sonra, karaciğerde toksinin %0.5 ile %5 arasında AFM_1'e biyotransforme olduğunu göstermiştir [Hussein ve Brasel, 2001].



Şekil 1.3. Bazı Aflatoksinlerin Kimyasal Yapıları

Aflatoksinlerin molekül formülleri, molekül ağırlıkları ve erime noktaları Tablo 1.3'te verilmiştir [Reddy ve Waliyar, 2014; Anonymous, 2014].

Tablo 1.3. Aflatoksinlerin Bazı Fiziksel Özellikleri

Aflatoksin	**Molekül Formülü**	**Molekül Ağırlığı**	**Erime Noktası**	**Maksimum UV Absorpsiyonu (ε(L mol^{-1} cm^{-1})), Metanol**	
				265 nm	**360-362 nm**
AFB_1	$C_{17}H_{12}O_6$	312	268-269	12,400	21,800
AFB_2	$C_{17}H_{14}O_6$	314	286-289	12,100	24,000
AFG_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	244-246	9,600	17,700
AFG_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	237-240	8,200	17,100
AFM_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	299	14,150	21,250$^{(2)}$
AFM_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	293	12,100$^{(1)}$	22,900$^{(2)}$
AFB_{2A}	$C_{17}H_{14}O_7$	330	240	-	-
AFG_{2A}	$C_{17}H_{14}O_8$	346	190	-	-

$^{(1)}$: 264 nm'deki absorpsiyon; $^{(2)}$: 357 nm'deki absorpsiyon

Aflatoksinler, kloroform, metanol ve dimetil sülfoksit gibi birçok polar çözücüde çözünebildikleri halde, suda ancak 10-20 mg/L konsantrasyonunda çözünürler. Aflatoksin kristalleri, 100°C üzerindeki sıcaklıklarda bile, ışık ve özellikle UV radyasyon yokluğunda son derece stabildirler. Özellikle, kuru halde erime noktası üzerindeki sıcaklık derecelerinde bile stabilitelerini korurlar. Ancak, hem nem hem de yüksek sıcaklık söz konusu olduğunda, dekarboksilasyonla lakton halkası açılır ve zamanla aflatoksin yıkımı gerçekleşir. Aflatoksinlerin lakton parçası, alkali çözeltilerde de hidrolize olmakla birlikte, bu reaksiyon tersinirdir. Zira, aflatoksin içeren bazik bir çözeltinin asitlendirilmesi sonrasında, lakton halkasının yeniden meydana geldiği ortaya konmuştur. Yine 100°C gibi yüksek sıcaklıklarda, dekarboksilasyon sonrası halkanın açılmasını aromatik halkadan metoksil grubunun ayrılması izleyebilir. Bir seri reaksiyon sonrası, amonyak ve çeşitli aminler de meydana gelebilir. Ortamda mineral asitlerin varlığı, furan halkasındaki çift bağ karşısına suyun bağlanmasını katalizler ve AFB_1 ve AFG_1, AFB_{2A} ve AFG_{2A}'ya dönüşür. Asetik anhidrid ve hidroklorik asit varlığında ise, reaksiyon daha da ilerler ve asitli türevler oluşur. Ayrıca, sodyum hipoklorür, potasyum permanganat, klor, hidrojen peroksit, ozon ve sodyum perborat gibi birçok oksitleyici ajanın da, aflatoksin molekülünü, farklı mekanizmalarla metabolize ettiği saptanmıştır. Bunlara rağmen, aflatoksinlerin pek çok gıda maddesinde

son derece stabil ve degradasyona karşı dirençli olduğu kabul edilmektedir. Ancak, protein varlığı, pH, sıcaklık ve proses süresi gibi faktörlerin, gıdalardaki aflatoksin stabilitesini ve konsantrasyonunu etkilediği de bir gerçektir. Bu gerçeğe dayanarak, aflatoksinlerin gıda ve yemlerde kontrolüne yönelik araştırmalar yoğun şekilde devam etmektedir [Feddern ve ark., 2013; Reddy ve Waliyar, 2014].

AFB_1 molekülünün fizikokimyasal ve biyokimyasal özellikleri, toksikolojik aktivite için iki önemli bölgeyi gösterir. Birinci bölge, furofuran halkasının 8,9 pozisyonundaki çift bağdır. Bu bölgede meydana gelen aflatoksin, protein ve DNA etkileşimleri, bu makromoleküllerin normal biyokimyasal fonksiyonlarını değiştirir ve hücresel seviyede istenmeyen etkiler oluşturur. İkinci reaktif grup, kumarin kısmındaki lakton halkasıdır. Lakton halkası da kolayca hidrolize olabilir ve bundan dolayı degredasyona eğilimlidir [Mishra ve Das, 2003; Mulunda ve Mike, 2014].

Aflatoksinler, ilk defa 1960'larda küflü yer fıstıklarından yapılan yemleri tüketen 100000'den fazla hindinin ölümüne yol açan epidemi sürecinde keşfedilmiş ve karakterize edilmiştir. 1974'te Hindistan'da aflatoksinle kontamine mısır tüketiminden yaklaşık 397 kişi etkilenmiş ve bunlardan 108'i ölmüştür. Bu salgında, kontamine mısırlarda aflatoksin seviyesinin 0.25-15 mg/kg vücut ağırlığı arasında olduğu kayda geçmiştir. 1982'de Kenya'da hastaneye intikal eden 20 hastadan %60'ı, kg vücut ağırlığı başına ortalama 38 µg aflatoksin alımına bağlı olarak kaybedilmiştir. Daha sonraları, aflatoksine bağlı ölümle sonuçlanan vakalar tekrarlamış ve 2004'te 125'i ölümle sonuçlanan toplam 317 vaka, 2005'te ise 32'si ölümle sonuçlanan 75 vaka kayıtlara geçmiştir [Mehan ve ark, 1991; Anonymous, 2004; Fernández-Cruz ve ark., 2010].

Aflatoksinler, insanlar, balıklar, kemirgenler, su kuşu, kanatlı kümes hayvanları, domuz ve büyükbaş hayvanlar dahil birçok hayvan için karsinojen olarak tanımlanan mikotoksinlerdir. Uluslararası Kanser Araştırma Dairesi (IARC), 1993'de, tüm mikotoksinleri insan karsinojenitelerine göre tasnif etmiş ve sonuçta trikotesenleri ve zearelenonları insan karsinojeni kabul edilmeyen üçüncü grup içine dahil ederken, okratoksin ve fumonisinleri muhtemel karsinojen olarak tanımlanan ikinci grup, aflatoksinleri ise yüksek karsinojen riski içeren birinci grup olarak değerlendirmiştir [Kumar ve ark., 2008; Zain, 2011]. Yapılan araştırmalar, aflatoksinlerin karsinojenik

potansiyellerinin, fraksiyonlarına göre farklılık gösterdiğini doğrulamıştır. Ördek yavrularında yapılan bir çalışmada AFB_1, AFG_1, AFB_2, AFG_2, AFM_1, AFM_2 toksinlerinin LD_{50} değerlerinin (popülasyonun %50'sini öldüren dozlarının) sırasıyla 18, 39, 84, 173, 17 ve 62 µg olduğu belirlenmiştir. Bu değerler esas alınarak, toksin fraksiyonlarının toksijenitesi için $AFB_1>AFG_1>AFB_2>AFG_2$ şeklinde bir sıralama olduğu ortaya konmuştur [Steyn ve Stander, 1999; McConnell ve Garner, 1994]. Ayrıca, *A. flavus*, *A. pseudotamarii* ve *A. ochraceoroseus*'un sadece AFB_1 ve AFB_2 toksinlerini ürettikleri, *A. nomius, A. bombycis* ve *A. parasiticus*'un ise, hem AFB_1 ve AFB_2 hem de AFG_1 ve AFG_2 toksinlerini ürettikleri tespit edilmiştir [Yu ve ark., 2002].

Aflatoksinlerin tüm canlı organizmalarda karsinojenite yanında, teratojenite ve mutajeniteye neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca, organizma üzerinde, DNA, RNA ve protein sentezi inhibisyonu, fosfolipidler, serbest yağ asitleri, trigliseritler ve kolesterol ve esterleri dahil olmak üzere lipid sentezi inhibisyonu, çeşitli enzimlerin aktivitelerinde azalma, glukoz metabolizması depresyonu ve pıhtılaşma faktörü inhibisyonu gibi son derece ciddi metabolik etkilerinin kanıtlanması, bu metabolitin önemini arttırmıştır [Trail ve ark., 1995; Hendriskse, 1997]. Ayrıca, aflatoksinin biyolojik etki düzeyinde, toksini bünyesine alan canlının cinsiyet, yaş, beslenme durumu ve diğer kimyasalların varlığı yanında, organizmanın toksine maruz kalma periyodu ve doz seviyesinin de çok önemli olduğu bildirilmiştir [Mishra ve Das, 2003].

Aflatoksinin olumsuz etkileri, insanlarda ve hayvanlarda, akut aflatoksikozis ve kronik aflatoksikozis olmak üzere genelde iki formda kategorize edilmiştir. Aflatoksin orta ve yüksek seviyelerde tüketildiği zaman akut aflatoksikozis kendini gösterir. Hastalığın spesifik ve akut ataklarına, kanama, ödem, sindirim sisteminin bozulması ve vakaların yaklaşık %25 oranında ölüme kadar ilerleyen şiddetli hepatotoksisite olarak açığa çıkan akut karaciğer hasarı dahildir. Aflatoksikozisin erken dönem hepatotoksik belirtileri, iştahsızlık, halsizlik ve düşük ateş olabilir. Akut seviyede maruziyet, kusma, karın ağrısı, sarılık, fulminan karaciğer yetmezliği ve ölümle sonuçlanabilir. Aflatoksin düşük ve orta seviyelerde tüketildiği zaman ise kronik aflatoksikozis görülür. Kronik aflatoksikozisin etkileri genellikle belirgin değildir ve dolayısıyla teşhis edilmesi güçtür. Ancak, akut ya da kronik tüm aflatoksin dozları, birikimsel etkiye sahiptir ve dolayısıyla kanser riski taşır [Lizárraga-Paulín ve ark., 2011].

Aflatoksikozis, sadece besinlerle aflatoksin alımı sonucu görülmez. Aynı zamanda, aflatoksinin solunması da hastalığa yol açabilir. Bunun bir kanıtı olarak, 1976'da unutulmaz klinik bir vaka yaşanmıştır. *A. flavus* ile kontamine yer fıstığı unu ile üç ay boyunca çalışan 68 yaşındaki bir kimya mühendisi, bu çalışma dönemi sonunda yüksek ateş, boğuk öksürük ve balgam ile belirti veren bir hastalığa yakalanmış ve teşhis sonucu, akciğerin sol alt lobunda bir kavitasyon olduğu tespit edilmiştir. Başlangıçta hastalığın tüberküloz olduğu düşünülmüş, ancak daha sonra mikotik olduğu anlaşılmıştır. İki ay sonra akciğer lezyonları ilerlemiş ve onbir ay sonra hasta ölmüştür. Akciğer dokusundan alınan örneğin incelenmesi, akciğerde aflatoksin olduğunu ve sonuç olarak aflatoksinlerle kontamine hava kaynaklı partikül tozların solunmasının akciğer kanserinin gelişmesine katkıda bulunduğunu göstermiştir [Lizárraga-Paulín ve ark., 2011].

1.4. *Aspergillus flavus*

Başlıca aflatoksin üreticisi olarak kabul edilen *A. flavus, Aspergillus* cinsi fungusların içinde yer almaktadır. *Aspergillus,* adlandırması en eski yapılan küf cinslerinden biridir. Fungusu mikroskobik olarak 1729'da inceleyen İtalyan biyolog Micheli'nin, sporlanma yapısını, Roma Katolik rahiplerinin ayin esnasında kutsal su serpmek için kullandıkları "asperges" ya da "aspergillum" olarak bilinen bir alete benzetmesi, cinsin taksonomisinin başlangıcı olmuştur [Bennett, 2010]. Ancak, taksonomik ve diğer mikolojik çalışmaların yapılması 19. yüzyılı bulmuştur. *Aspergillus* cinsinin ilk tanımlaması 1809 yılında Link tarafından yapılmıştır. Thom ve Church adlı araştırıcılar, 1926 yılında *Aspergillus* cinsini 13 gruba ait 69 tür içinde organize etmişlerdir. Daha sonra 1945 yılında, Thom ve Raper bu cinsin 14 gruba bağlı 77 türe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Raper ve Fennell, ilk olarak 1965 yılında yayınlanan "The Genus *Aspergillus*" adlı kitapta, *Aspergillus* cinsini 150 takson olarak tanımlamışlardır. *Aspergillus* taksonomisinde birçok değişmeler olmasına rağmen, bu kitap hala en önemli başvuru kaynağıdır. Bu kitapta *Aspergillus* cinsi, 18 grup ve 132 tür altında toplanmıştır. Ayrıca burada, 28 yeni türün de tanımlamasına yer verilmiştir. Günümüzde, *Aspergillus* cinsi içinde yaklaşık 250 takson listelenmektedir [Christensen ve Tuthill, 1985; Samson ve Varga, 2010].

Son moleküler çalışmalarla desteklenen monofiletik sınıflandırmaya göre, *Aspergillus*, Ascomycota'nın Eurotiomycetes sınıfına dahil edilmiş Eurotiales takımının

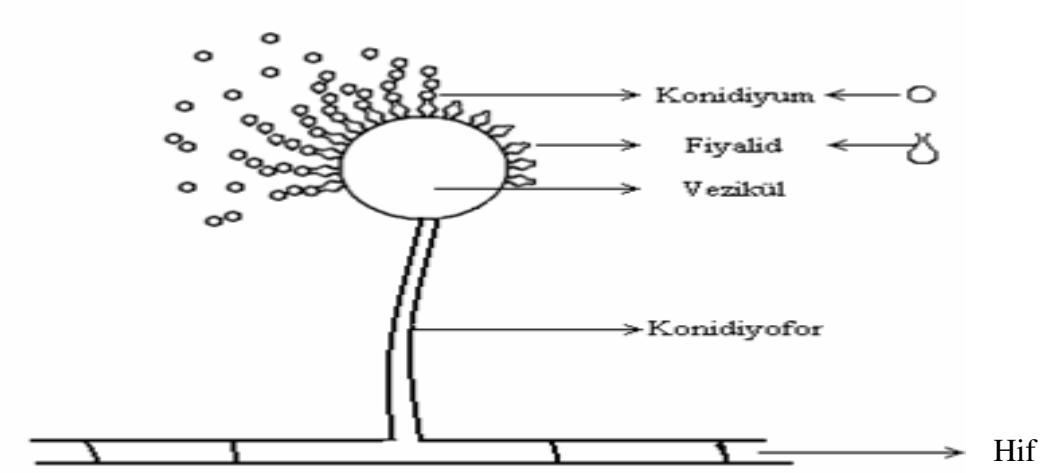
Trichocomaceae ailesinin üyesi olarak kabul edilmektedir. *Aspergillus* cinsi, filogenetik olarak Aspergillus, Fumigati, Circumdati, Candidi, Terrei, Nidulantes, Warcupi ve Ornati olmak üzere 8 altcinse ayrılmıştır. Tablo 1.4'te görüldüğü gibi, bu altcinsler içinde bir ya da daha fazla grup yer almaktadır [Samson ve Varga, 2010].

Tablo 1.4. *Aspergillus* Cinsinin Taksonomik Özeti

Altcins	**Grup**	**Teleomorf**
Aspergillus	Aspergillus	Eurotium
	Restricti	Eurotium
Fumigati	Fumigati	Neosartorya
	Clavati	Neocarpenteles, Dichotomomyces
	Cervini	-
Circumdati	Circumdati	Neopetromyces
	Nigri	-
	Flavi	Petromyces
	Cremei	Chaetosartorya
Candidi	Candidi	-
Terrei	Terrei	-
	Flavipedes	Fennellia
Nidulantes	Nidulantes	Emericella
	Usti	Emericella
	Sparsi	-
Warcupi	Warcupi	Warcupiella
	Zonati	Penicilliopsis
Ornati	Ornati	Sclerocleista

Circumdati altcinsi içinde yer alan Flavi grubu, gıdalar açısından önemli küf türlerini barındıran bir gruptur. *A. oryzae, A. sojae* ve *A. tamarii* gibi bu grubun bazı üyeleri, geleneksel gıdaların fermentasyon prosesinde rol oynarken, *A. flavus, A. parasiticus, A. pseudotamarii, A. bombycis, A. toxicarius, A. parvisclerotigenus, A. minisclerotigenes* ve *A. arachidicola* gibi Flavi grubu üyeleri ise, toksijenik ikincil metabolitler üretirler [Samson ve Varga, 2010]. Dolayısıyla *Aspergillus*, hem yararlı hem de patojen bir dizi farklı türleri içeren filamentöz küflerden oluşmuş bir cinstir. Tüm küfler gibi *Aspergillus* türleri de, ökaryotik ve heterotrofik çok hücreli organizmalardır [Anonymous 2014b]. İnsan ölümlerinden sorumlu olan *A. fumigates*, önemli bir bitki zararlısı olan *A. flavus*, önemli bir model organizma olan *A. nidulans*, bazı yaygın türlerdendir [Gibbons ve Rokas, 2013].

Aspergillus türlerinin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin örtüşmesinden dolayı tanımlanmaları oldukça güçtür. *A. flavus* türü içindeki küfler, besi ortamına göre değişmekle beraber, makroskobik olarak genellikle önden bakıldıklarında sarıdan yeşile ve kahverengiye kadar değişen, tersten bakıldıklarında ise altın kırmızısı-kahverengi renklerde, genellikle kadifemsi görünümde küflerdir. Konidiyoforları, değişken uzunlukta olup, tırtıklı, oyuklu ve iğnelidir. Tek ya da çift konidiyoforlar, tüm vezikülü kaplar ve tüm yönlerde fiyalidler yer alır. Konidiyumlar küresel ya da hemen hemen küresele yakın şekildedir ve belirgin olarak kenarları üzerinde küçük çıkıntılar vardır ve çapları 3,5-4,5 mm arasındadır [Hedayati ve ark., 2007]. Şekil 1.4'te *Aspergillus* cinsi içinde yer alan türlerin genel mikromorfolojik yapısı görülmektedir.



Şekil 1.4. *Aspergillus* Türlerinin Genel Mikromorfolojik Yapısı

Küflerde, miselyum ayrımı sürecinde, bazı hücreler genişler, sert bir hücre duvarı gelişir ve hücrenin uzun eksenine dikey tek bir konidiyofor üreten 'T' veya 'L' şeklinde "ayak hücreleri" oluşur. Belirgin ayak hücrelerinin bulunması, *Aspergillus* cinsi küfleri, diğer küflerden ayırt eden özelliklerindendir. Ayak hücresinden gelişme gösteren dik hif dalı, konidiyofordur ve uçlarında yuvarlak, elips ya da çomak şeklinde kesecik (vezikül) oluşturmak üzere genişler. Vezikülün fertil bölgesi, fiyalid adı verilen bir hücre tabakası ile çevrilidir. Fiyalid ise, konidiya veya konidiyospor adı verilen uzun mikotik spor zincirleri ile çevrilidir. Bu sporların boyutu, dizilimi ve renkleri, önemli tanımlayıcı özellikler olarak kullanılır. Örneğin, *A. niger* siyah, *A. ochraceus* sarı-kahverengi, *A. fumigatus*, *A. nidulans* ve *A. flavus* yeşil sporları ile ayırt edilirler [Hedayati ve ark., 2007].

Aspergillus sporları, hava akımı ile sürüklendiklerinden hem kısa hem de uzun mesafede yayılarak aerosollerin bileşimine dahil olurlar. Katı veya sıvı bir yüzeyle temas ettiklerinde ve biriktiklerinde, nem koşulları uygun olduğu zaman çimlenebilirler. Dolayısıyla, hemen hemen her yerde bulunabilirler. *Aspergillus* cinsi küfler, kendilerine özgü beslenme stratejileri ile de diğer küflerden ayrılırlar. Polimerik molekülleri, çevrelerine asit ve enzim salgılayarak daha küçük moleküllere parçalarlar ve daha sonra bu molekülleri fungal hücreye absorblarlar. Yaygın olarak karasal ortamda bulunurlar ve en çok topraktan ve toprakta yetişen bitki kumundan izole edilirler. Bu küfler tarafından gerçekleştirilen dekompozisyon prosesi, özellikle karbondioksit ve diğer inorganik bileşenlerin temin edilip tekrar yerine konulduğu karbon döngüsünde, kimyasal elementlerin doğal döngüsünün sürmesi anlamında önemlidir [Hedayati ve ark., 2007].

Diğer *Aspergillus* türleri gibi *A. flavus*, doğada yaygın bir dağılım gösterir. Bu durum, muhtemelen hava hareketiyle ve böcekler vasıtasıyla kolayca yayılan çok sayıda konidiya üretmesine bağlıdır [Hedayati ve ark., 2007]. Besinini depolanmış tahıllar, bitki artığı, ağaç yaprakları, çürümüş ağaç, hayvan yemi, gübre yığınları, ölü böcekler ve hayvan karkasları gibi canlı olmayan organik maddelerden temin edebilir [Klich, 1998]. *A. flavus*, toprakta bir saprofit olarak bulunmasından ve bitki ve hayvan artıkları ile beslenmesinden dolayı, besin geri döngüsünü sağlamakta önemli bir rol oynar. Zor şartlarda yaşama yeteneği sayesinde, toprakta ve bitkilerde bulunan ve substratlar için yarışan diğer organizmaların kolayca rekabet dışı kalmasını sağlar [Hedayati ve ark., 2007].

A. flavus, en iyi 0.86-0.96 arasındaki su aktivitesinde gelişir. Fungal gelişmenin geniş bir sıcaklık aralığında (12-48°C) gözlenmesine rağmen, optimum gelişme sıcaklığının 37°C olması, insanlardaki patojenisitesine katkı sağlayan bir etmendir [Hedayati ve ark., 2007]. İmmün sistemi baskılanmış sıcak kanlı memelilerde kolayca gelişebilir ve hem insanlarda hem de hayvanlarda invaziv ve invaziv olmayan aspergillozise neden olabilir [Yu ve ark., 2005].

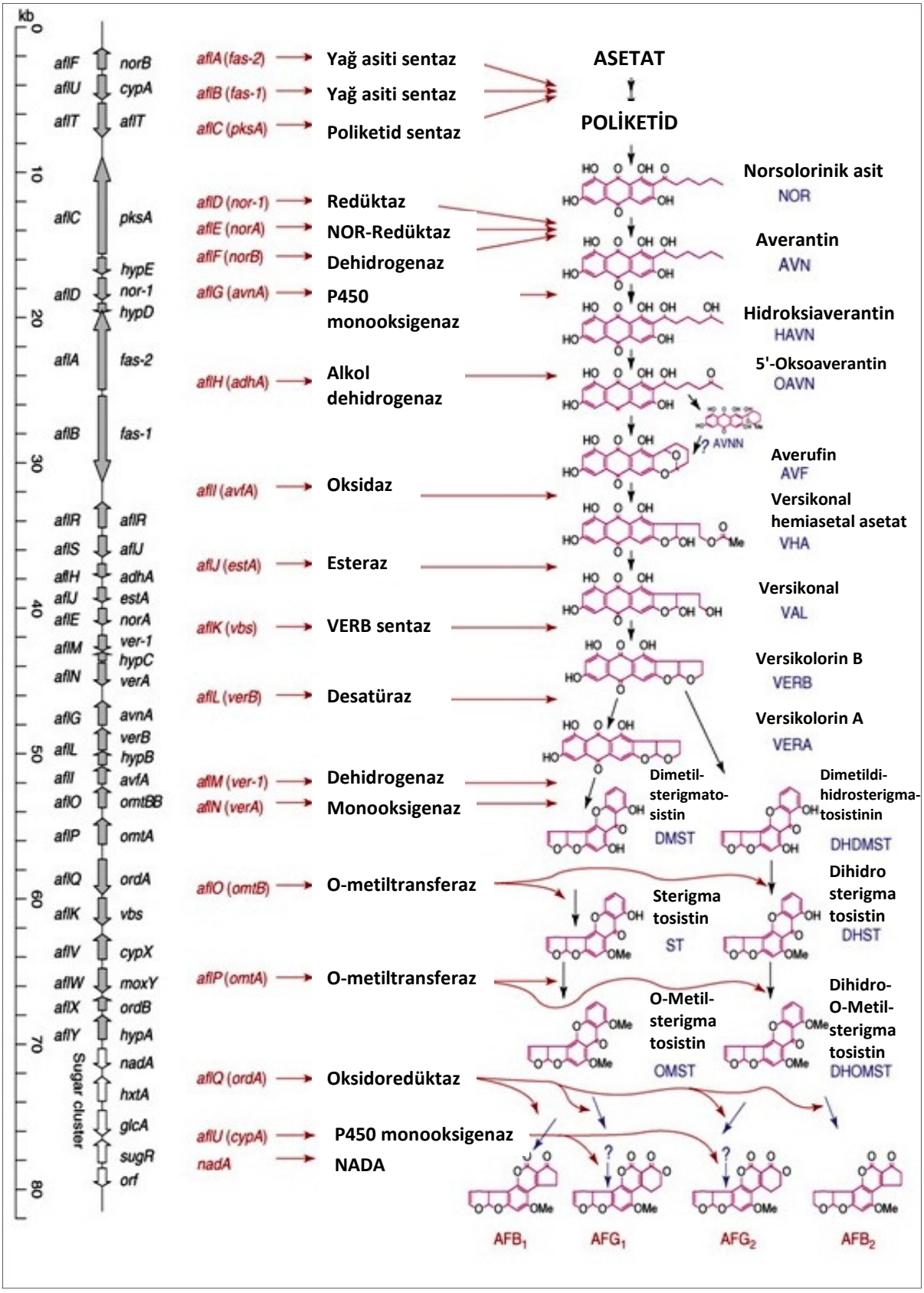
A. flavus, aflatoksin dışında, siklopiazonik asit, kojik asit, betanitropropiyonik asit, aspertoksin, aflatrem ve aspergillik asit gibi diğer toksik bileşenleri de üretme yeteneğindedir [Yu ve ark., 2008]. *A. flavus* suşlarının yaklaşık %35'inin aflatoksijenik

yani aflatoksin üreticisi olduğu kabul edilmektedir. Ancak aflatoksijenik küfün ortamda varlığı, aflatoksinin varlığı anlamına gelmemektedir. Toksijenik suşların tarlada stres koşulları altında ya da gelişmeleri için uygun sıcaklık ve yüksek nem şartlarında depolanan ürünlerde de aflatoksin ürettiği bilinmektedir [Feddern ve ark., 2013]. Ayrıca, *A. flavus*, zayıf bir fırsatçı bitki patojeni olmasına rağmen, *A. flavus*'un enfekte ettiği bitkilerde böcek hasarı, doku hasarı gibi mekanik hasarlar varsa, o bitkide hasat öncesi aflatoksin oluşma riski yüksektir [Guo ve ark., 2009].

1.5. Aflatoksin Biyosentez Mekanizması

Aflatoksin biyosentez metabolik yolu üzerindeki araştırmalar, fungal ikincil metabolizma çalışmaları arasında büyük bir yere sahip olup farklı disiplinlerde faaliyet gösteren birçok bilim insanı tarafından 30 yılı aşkın bir süredir yürütülmektedir. Mevcut araştırma sonuçları, aflatoksinlerin asetattan başlayan bir metabolik yolda sentezlenen poliketid türevi ikincil metabolitler olduğunu ve aflatoksinlerin biyosentezine birçok yapısal ve düzenleme genleri ile bu genler tarafından kodlanan enzimlerin dahil olduğunu göstermiştir [Trail ve ark., 1995]. Ayrıca, aflatoksin biyosentez metabolik yolunda yapısal olarak tanımlanmış en az 15 ara ürün oluştuğu, 23'ten fazla enzimatik reaksiyon gerçekleştiği ve bu metabolik yolda 70 kb'lık bir DNA bölgesi üzerinde kümelenmiş yaklaşık 25 genin görev aldığı ortaya konmuştur [Yu ve ark., 2004].

Kompleks ve son derece organize bir seri oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları sonucu oluşan aflatoksinlerin biyosentez metabolik yolunu gösteren şema, Şekil 1.5'te verilmiştir.



Şekil 1.5. Aflatoksin Biyosentez Metabolik Yolu [Yu ve ark., 2004]

Aflatoksin biyosentez aşamaları, genel hatlarıyla şu şekildedir: Hekzanoil CoA → norsolorinik asit, NOR → averantin, AVN → hidroksiaverantin, HAVN → averufin, AVF → hidroksiversikoloron, HVN→ versikonal hemiasetal asetat VHA→ versikonal, VAL → versikolorin B, VER B → versikolorin A, VER A → dimetil-sterigmatosistin, DMST → sterigmatosistin, ST → O-metilsterigmatosistin, OMST → AFB_1 ve AFG_1. Metabolik yolda, VHA üretiminden ayrılan bir kol, aflatoksinlerin farklı yapısal formları olan AFB_2 ve AFG_2 oluşumunu yönlendirmektedir [Yu ve ark., 2002].

Aflatoksin metabolik tanımlanan başlıca yapısal genler, *nor-1, ver-1* ve *omtA* genleridir. Gen adları, genin ürünü olan enzim tarafından dönüştürülen substrattan ya da gerçekleşen enzimatik reaksiyondan ileri gelmektedir. Substratlara göre isimlendirilen genler, *nor-1* (NOR), *norA* (NOR), *norB* (NOR), *avnA* (AVN), *avfA* (AVF), *ver-1* (VERA), *verA* (VERA) ve *verB* (VERB) genleridir. Burada, gen isminin yanındaki parantez içinde substrat ismi bulunmaktadır. Diğer genler ise, enzimatik fonksiyonlarına göre adlandırılmıştır. Bunlara da, *fas-2* (FASα altbirimi), *fas-1* (FASβ altbirimi), *pksA* ya da *pksL1* (poliketid sentaz), *adhA* (alkol dehidrogenaz), *estA* (esteraz), *vbs* (VERB sentaz), *dmtA* (*mt-I*) (O-metiltransferaz I) ya da *omtB* (O-metiltransferaz B), *omtA* (O-metiltransferaz A), *ordA* (oksidoredüktaz A), *cypA* (sitokrom P450 monooksigenaz), *cypX* (sitokrom P450 monooksigenaz) ve *moxY* (monooksigenaz) dahildir. Burada da, gen isminin yanındaki parantez içinde enzim ismi verilmiştir [Yu ve ark., 2004].

Aflatoksin metabolik yolunda yapısal genlere ek olarak, düzenleyici genler olduğu da gösterilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, ilk olarak hem *A. flavus* hem de *A. parasiticus*'da bulunan *aflR* geni klonlanmıştır. Bu gen, başlangıçta *A. flavus* için "*afl2*" ve *A. parasiticus* için "*apa2*" olarak adlandırılmış, ancak daha sonra genelleştirilerek her iki küf için de *aflR* olarak ifade edilmiştir. Aflatoksin biyosentezine dahil olan 25 genin isimlendirmesi bu sistemle yapılmış, yani aflatoksini simgeleyen "afl" harflerinin yanına alfabetik sırayla A'dan Y'ye kadar büyük harfler getirilmiştir [Yu ve ark., 2004; Chang ve ark., 1993; Yu ve ark., 1995].

Aflatoksijenik *Aspergillus* türlerinde *aflR*, temel transkripsiyonel düzenleme geni olduğundan, *aflR* eksikliğinde, aflatoksin biyosentezi ile ilgili genlerin ekspresyonunun gerçekleşmediği ve aflatoksin üretilemediği ifade edilmiştir. *AflR*'ye bitişik fakat *aflR*'den farklı şekilde transkripsiyon olan diğer bir gen de *aflJ*'dir. *AflJ*, biyosentez

yolunda bulunan diğer genler ve proteinlerle belirgin bir benzerlik göstermemekle ve fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber, aflatoksin oluşumunda dizide yer alan diğer genlerin ekspresyonu için *aflR* gibi gerekli olduğu kabul edilmektedir [Chang ve ark., 1995; Bhatnagar ve ark., 2006].

Aflatoksinlerin sentezi, malonil CoA'dan başlar ve öncelikle hekzanoil CoA, daha sonra dekaketid antrakuinon oluşumu gerçekleşir [Yu ve ark., 2010]. Asetil CoA'dan poliketid sentezinde üç enzim rol alır. Bunların biri poliketid sentaz (PKS) enzimi olup, diğer ikisi de yağ asiti sentaz (FASα ve FASβ) enzimleridir [Watanabe and Townsend, 2002]. Aflatoksin biyosentez gen kümesi, 25 genden oluşan yaklaşık 70 kb'lik bir DNA dizisi ile tanımlanmaktadır. Bir gen, ortalama büyüklüğü yaklaşık 2.8 kb olan kromozomal DNA'dan oluşmaktadır. FASα ve FASβ enzimlerini kodlayan genler, sırasıyla 5.8 kb ve 5.1 kb iken, PKS enzimini kodlayan gen 6.6 kb'dır. Bu 3 büyük gen hariç, diğer 22 genin ortalama büyüklüğü yaklaşık 2 kb'dır [Yu ve ark., 2004]. Aflatoksin biyosentezi için PKS'nin fonsiyonel etki alanlarını dikkatle inceleyen araştırmacılar, daha sonra *aflC* olarak da isimlendirilen *pksA* geni tarafından dönüştürüldüğü tahmin edilen ürünün norantron olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, norantronun metabolik yoldaki ilk stabil ara ürün olan NOR'a dönüşümü zayıf bir şekilde de olsa tanımlanmış, fakat bazı araştırmacılar bu dönüşümün, norantron oksidaz ve monooksigenaz tarafından katalizlendiğini, bazıları ise kendiliğinden meydana geldiğini ileri sürmüştür. Zira sekans çalışması ve enzimatik analizlerle, *pksA* ve *nor-1* genlerinin intergenik bölgesinde yer alan *hypC* gen ürününün norsolorinik asit antronun NOR'a oksidasyonunu katalizleyen norantron oksidaz enzimini gerektirmesi bu bakış açısını desteklenmiştir [Yu ve ark., 2011].

NOR'un AVN'ye dönüşümünde, *nor-1, norA* ve *norB* genleri işlevseldir. Bu durum, hem *A. flavus*'da hem de *A. parasiticus*'da gösterilmiştir. Ancak ne *norA* ne de *norB*, amino asit ya da DNA dizisi itibari ile *nor-1* genine belirgin bir benzerlik göstermemektedir. Klonlanan ilk aflatoksin biyosentez geni, *A. parasiticus*'da *nor-1* olmuştur. *Nor-1* (*aflD*) geni aflatoksin biyosentez yolunun ilk stabil ara ürünü olan NOR'un AVN'ye indirgenmesini katalizleyen enzimi kodlayan gendir [Yu ve ark., 2004; Trail ve ark., 1994].

AVN'nin HAVN'ye dönüşümü için ilk kanıtlar, radyoizotop birleştirme denemeleri ile ortaya konulmuştur. Bu çalışmalar, NOR'un AVF'ye dönüşümünü üç enzimatik adımla izah etmişlerdir. Buna göre NOR, önce bir redüktaz enzimi tarafından AVN'ye katalizlenir. Aynı zamanda NOR, bir monooksigenaz tarafından da HAVN'ye dönüştürülür. Son olarak, HAVN'nin AVF'ye dönüşümü ikinci bir dehidrogenaz ile katalizlenir. Ayrıca, bu oksidasyon reaksiyonlarının tersinir olduğu ve tercih edilen kofaktörün de nikotinamid adenin dinüklotit fosfat (NADPH) olduğu ortaya konmuştur. Monooksigenazı kodlayan gen, *ord-1* olarak adlandırılmıştır. Çalışmalar, AVN'nin AVF'ye dönüşümünde HAVN'nin bir ara ürün olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca pek çok çalışma, AVF'nin aflatoksin oluşumunda kilit ara ürünlerden biri olduğunu kanıtlamıştır. AVN'den AVF oluşumunda çeşitli ara ürünler de belirlenmiştir. Bunlardan averufaninin (AVNN), doğrudan bir aflatoksin ara ürünü olmayıp metabolik yolda oluşan bir yan kola ait bir ara ürün olduğu ve *A. parasiticus*'da alkol dehidrogenazı kodlayan *aflH* genini karakterize ettiği rapor edilmiştir. HAVN'nin doğrudan ya da dolaylı olarak ilave bir enzimle AVNN'ye dönüşebildiği ve iki enzim varlığında HAVN ve AVF arasında 5'-oksoaverantin (OAVN) adı verilen yeni bir ara ürün oluştuğu belirlenmiştir. HAVN'den OAVN oluşumu, *aflH* geni tarafından kodlanmaktadır. *AflH*'nin mutant geni olan alkoldehidrogenaz geni *adh1*, *A. flavus*'un aflatoksin üretiminde, aflatoksin genleri ile eşzamanlı olarak ekspres olmaktadır. AVF'nin oksidasyonu ile bir aflatoksin öncülü olan VHA oluşur. Bu dönüşümde, *aflI* (*avfA*) geninin rol aldığı gösterilmiştir. VHA'nın VAL'e dönüşümü ise, bir esteraz enzimini kodlayan *aflJ* (*estA*) geni tarafından gerçekleştirilir. VAL'den VER B'e dönüşümde, *aflK* (*vrb*) geninin rol aldığı, aflatoksin oluşumunda kritik bir ürün olan VER B'den VER A'ya dönüşümün ise, hem *A. flavus* hem de *A. parasiticus*'un aflatoksin biyosentez yolundaki gen kümelerinde bulunan *aflL* (*verB*) geninin rol oynadığı ortaya konmuştur. Bununla birlikte, kültürel şartların, VER B desatüraz enzim aktivitesini önemli ölçüde etkilediği ve bu durumun son ürün olan AFB_1, AFB_2, AFG_1 ve AFG_2 oranlarına yansıdığı da belirlenmiştir [Yu ve ark., 2011].

Aflatoksin biyosentez metabolik yolunda ayrıntılı olarak çalışılmış reaksiyonlardan biri de, VER A'dan DMST'ye biyokimyasal dönüşümdür. Çalışmalarda, *aflM* (*ver-1*) geninin ketoredüktaz enzimini kodladığı ve VER A'nın dönüşümde rol aldığı ortaya konmuştur. Enzim saflaştırma çalışmalarında, O-metiltransferaz I ve O-metiltransferaz

II enzimleri tanımlanmıştır. O-metiltransferaz I, S-adenozilmetiyonindeki metilin DMST ve dimetildihidrosterigmatosistinin (DHDMST) hidroksillerine transferini katalizler ve bunun sonucu sırasıyla, ST ve dihidrosterigmatosistin (DHST) oluşur. Bu dönüşümden sorumlu genin *aflO* (*omtB*) olduğu anlaşılmıştır. ST'nin tekrar OMST'ye ve DMST'nin dihidro-O-metilsterigmatosistine (DHOMST) dönüşümü, *aflP* (*omtA*) geninin ekspresyonu ile gerçekleşir. Ancak bu genin homologu, aflatoksijenik olmayan *Aspergillus* türlerinde de tespit edilmiştir. Aflatoksin biyosentez metabolik yolundaki son biyokimyasal dönüşüm OMST'nin AFB_1 ve AFG_1'e, DHOMST'nin AFB_2 ve AFG_2'ye dönüştüğü reaksiyonlardır. Bu reaksiyon için *aflQ* (*ordA*) geninin gerekli olduğu bilinmekle beraber, G grubu aflatoksinlerin oluşumunda ilave enzim ya da enzimlere ihtiyaç olduğu ileri sürülmüştür. Son çalışmalar, *cypA* ve *nadA* genlerinin de aflatoksin gen kümesinin birer üyesi olduğunu göstermiştir. Yine son çalışmalar, AFB_1 oluşumunda son iki adımda *aflE* (*norA*) geninin yer aldığı hipotezi ile *A. flavus*'un sadece AFB_1 ve AFB_2 üretirken *A. parasiticus*'un dört majör aflatoksin fraksiyonunu üretebildiği gerçeğini desteklemiştir. Çalışmalar, aynı zamanda, G-grubu aflatoksin üreticisi olan *A. parasiticus*'un *nadA* ve *norB* genlerine sahip olduğunu, AFG_1 ve AFG_2 oluşumunda ağırlıklı olarak *norB* geninin yer aldığını göstermiştir [Yu ve ark., 2011].

Toksijenik *Aspergillus* cinslerinde aflatoksin üretimini, gerek besinsel gerekse çevresel, biyotik ve abiyotik faktörlerin etkilediği bilinmekle beraber, bu etkilerin moleküler mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Karbon, azot, amino asit, lipit ve eser elementler, aflatoksin üretimini etkiler. Glukoz, sukroz ve maltoz gibi basit şekerler, aflatoksin oluşumunu destekler, fakat pepton, sorboz ya da laktoz, toksin oluşumunu teşvik etmez. Ancak, aflatoksin metabolik yolundaki genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde karbon kaynaklarının etkisi, tam olarak anlaşılamamıştır [Guo ve ark., 2011]. Aflatoksijenik küf ile kontamine olmuş tohum embriyosunda glukoz ve sukroz gibi basit şekerlerin yüksek seviyede bulunduğu durumlarda, aflatoksin üretiminin de en yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir [Woloshuk ve ark., 1997; Payne ve ark., 1998]. Ancak, pepton ya da nişasta gibi kompleks karbonhidratların, aflatoksin biyosentezini indüklemediği kaydedilmiştir [Yu ve ark., 2000]. Azot kaynağı, aflatoksin oluşumunu değişik şekillerde etkiler. Bazı *Aspergillus* izolatları için, azot toksin oluşumunu destekleyen bir faktör olduğu halde, bazıları için de nitratın aflatoksin oluşumunu baskıladığı görülmüştür [Kachholz ve ark., 1983]. *Aspergillus* spp.'nin aflatoksin

üretme düzeyi, ortamda nitrit veya nitrat bulunması durumunda farklılık gösterir. Triptofan gibi bazı amino asitlerin aflatoksin üretimi üzerine olumsuz etkiye sahip olduğu bilinirken, tirozinin aflatoksin üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Metal iyonlarının da, aflatoksin metabolik yolu gen ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir. Lipit substratı da, aflatoksin oluşumunu destekleyen iyi bir karbon kaynağıdır. *A. flavus*'da aflatoksin biyosentezinin asidik ortamda arttığı, alkali ortamda ise inhibe olduğu kanıtlanmıştır [Yu, 2012].

Aflatoksin oluşumunu indükleyen, küf izolatına, ürüne ve ortam şartlarına bağlı pekçok indüksiyon faktör olmakla birlikte, en temel parametreler, su aktivitesi, sıcaklık, pH, karbon ve azot kaynakları ile diğer besinlerdir [Calvo ve ark., 2002; Furtado ve ark., 2005]. Bunlar arasında ise, su aktivitesi ve sıcaklık arasındaki etkileşim, fungal gelişme ve mikotoksin üretimi için en kritik faktörlerdir. Mikotoksin üretimi için uygun şartlar, küfün gelişme şartlarına kıyasla genellikle daha kısıtlayıcıdır ve aynı türler tarafından üretilen farklı mikotoksinler ve aynı mikotoksini üreten küfler arasında bile farklılık gösterir [Gqaleni ve ark., 1997].

Aflatoksin üreten küflerin gelişme sıcaklıkları geniş bir aralıkta değişmektedir. *A. flavus*'un 19-35°C arasında iyi gelişebildiği, optimum gelişme sıcaklığının ise 28-30°C arasında olduğu kabul edilirken, optimum düzeyde toksin üretiminin 12-42°C, 24-35°C ya da 33°C gibi farklı sıcaklıklarda olduğunu ortaya koyan araştırmalar [Gqaleni ve ark., 1997; Bhat ve ark., 2009; Milani, 2013] mevcuttur. Diğer taraftan, *A. flavus*'un minimum su aktivitesi gereksiniminin de 0.71-0.74 arasında olduğu, optimum 0.98 a_w'de gelişebildiği [Kozakiewicz ve Smith, 1994], aflatoksin üretebilmesi için ise, minimum 0.85 ve optimum 0.95 ya da 0.98 a_w koşulunun sağlanması gerektiğini gösteren farklı veriler [Sanchis ve Magan, 2004; Ribeiro ve ark., 2006] bulunmaktadır.

1.6. Aflatoksin Tespit Yöntemleri

Gıdalarda ve yemlerde aflatoksin ve diğer tüm mikotoksinlerin varlığının ortaya konulması ile birlikte, bunların tespitine yönelik analiz yöntemlerinin belirlenmesi çalışmalarına yoğunlaşılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda pek çok analiz yöntemi ortaya konulmakla birlikte, aflatoksinlerin tespiti için kullanılan en yaygın yöntemler, kromatografik ve immünolojik esaslı yöntemler olmuştur. Ancak, hem mevcut yöntemlerin hassasiyetlerinin ve tekrarlanabilirliklerinin arttırılması yönünde hem de

daha duyarlı ve güvenilir yeni yöntemlerin bulunması amacıyla araştırmalar hala devam etmektedir.

Mikotoksinlerin tespiti için kullanılan kromatografik metotlar, ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) ve sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi (LC/MS) olarak sayılabilir.

Düzlemsel kromatografi olarak da bilinen TLC, aflatoksinleri ayırma, saflık değerlendirmesi ve tanımlama amacıyla kullanılan tekniklerden biridir. TLC, cam ya da plastik bir levha üzerine immobilize edilmiş sabit bir faz ve bir solventten oluşan hareketli fazdan oluşur. Numune, sıvı ya da uçucu bir çözücü içinde çözünmüş olarak sabit faza nokta şeklinde uygulanır. Daha sonra, kromatografik plaka, dikey olarak bir çözücü rezervuarına yerleştirilir ve kapiler hareket ile çözücü ilerler. Çözücü sabit fazda belli bir sınıra ulaştığında çözücü rezervuarından plaka uzaklaştırılır. Ayrılan noktalar, uygun bir reaktif spreylenerek ultraviyole ışık ile görünür hale getirilir. Numune ile eş zamanlı yürütülen standart yardımıyla numunenin içeriği tanımlanabilir. Bir karışımdaki farklı bileşenler, mobil sıvı faz ve sabit faz arasında ayrılma davranışlarındaki farklılıklardan dolayı, plaka üzerinde farklı oranlarda ilerlerler. Numune beneğinin başlangıç noktasına uzaklığının, çözücünün başlangıç noktasına uzaklığına oranı, alıkonma faktörü (Rf) olarak hesaplanır ve standartların Rf değerleri ile numunenin Rf değeri karşılaştırılır. TLC ile aflatoksinlerin tayininde, genellikle silika plakalar tercih edilir. Çok çeşitli solvent sistemleri denenmiş olmakla birlikte, az miktarda metanol veya aseton içeren kloroform, toluen-etil asetat ya da aseton-izopropanol karışımlarının kullanımı yaygındır [Hussain, 2011; Manetta, 2011].

1980'lerden sonra analitik laboratuvarlar, TLC'den daha üstün performans ve güvenilirliğine sahip HPLC'ye geçmişlerdir. HPLC, tüm mikotoksin analizleri için miktar belirlemede, yüksek seçicilik ve hassasiyete sahip son derece duyarlı bir tekniktir. Aflatoksin analizinde HPLC ile ekstraksiyon ve yıkama işlemlerinden sonra, son ayırma ve tespit aşamaları yürütülür. HPLC'de sıvı mobil faz ya da solvent, numuneyi içine sabit faz doldurulmuş kolona taşımak için kullanılır. Analit, iki faz arasından kolon aracılığıyla geçerken ayrılır ve böylece ayrılma katsayıları arasındaki fark, bileşenlerin ayrımına yol açar. HPLC'de, numunenin yapısına bağlı olarak,

çoğunlukla ultraviyole (UV) dedektör, diyot grubu dedektör (DAD) ya da floresan dedektör (FLD) gibi farklı dedektörler kullanılarak tespit gerçekleştirilir. Aflatoksin için floresan tespitinde, elektromanyetik radyasyonun (365 nm) absorpsiyonu ile daha yüksek enerji seviyelerine uyarılmış moleküllerin ışık emisyonundan (435 nm) yararlanılır. Floresan tespiti, diğer tespit sistemlerinden daha yüksek hassasiyete sahiptir ve hassasiyeti arttırmak için analitin türevlendirilmesi gerekir. Aflatoksin analizlerinde, genellikle sabit faz olarak C-18'in kullanıldığı ters faz HPLC sistemi kullanılır. Düşük seviyelerde tespit için, kolon öncesi ve kolon sonrası, türevlendirme gereklidir. Türevlendirme, kuvvetli asitlerle veya brom, iyot ya da trifluoro-asetik asit gibi oksidanlarla gerçekleştirilir. Tüm HPLC sistemleri, birçok bileşenin bir araya gelmesi ile oluşur. Temel bileşenler, sıvı pompası, kolon fırını, sistem kontrolörü, dedektör, bağlantı veri modülü ve yazılımdır. HPLC sistem, kromatogram şeklinde sonuç verir. Bir kromatogram, kalitatif ve kantitatif olmak üzere iki tip analitik bilgi verir. HPLC kromatogramında, alıkonma zamanı x-ekseninde, pik yüksekliği y-eksenindedir. Alıkonma zamanı tanımlama amacı ile, pik alanı miktar tespit etme amacı ile kullanılır [Hussain, 2011].

LC-MS'in, aflatoksinlerin tespitinde kullanımı oldukça yeni bir gelişmedir. LC-MS, HPLC ile kütle spektrometresi ünitelerinin birlikte kullanıldığı en ileri düzeyde tekniklerden biridir. Zaman alıcıdır ve uzmanlık bilgisi gerektirir. Kütle spektrometresi analizinde, tespit öncesi, ekstraksiyon ve yıkama tekniklerinin kullanılması gerekir. LC-MS'de, HPLC çıkış maddesi, bir püskürtücü aracılığı ile bir iyonlaşma kompartımanına girer. İyonlaşma için elektrosprey, termo-sprey, kimyasal ve hızlı atom bombardımanı olarak adlandırılan çeşitli teknikler vardır. Parçalanma, bir çarpışma kompartımanında gerçekleşir. Daha sonra parçalar, tespit işleminin yapılacağı kütle spektrometresinin yüksek vakum bölgesine girerler. En ideal tanımlama ve miktar belirleme için, çeşitli düzenekler mevcuttur. Üçlü dörtlü enstrümanlar, daha hızlı tarama ve daha yüksek hassasiyet ile kantifikasyon için daha iyi bilgi sağladıkları halde, iyon yakalama enstrümanları, tanımlama için üçlü dörtlü enstrümanlardan daha uygundur. Ayrıca, her iki düzenekte de en iyi sonuçlar almak için uygun hibrid enstrümanları vardır. LC-MS metotları ile pikogram seviyesinde, aflatoksin tespiti yapılabilmektedir [Hussain, 2011].

İmmünolojik metotlar, aflatoksinler için monoklonal veya poliklonal antikorların afinitelerine dayanmaktadır. Biyoteknolojideki gelişmeler sayesinde, günümüzde

gıdalarda aflatoksinleri on dakikadan daha kısa bir sürede bile ölçebilen son derece spesifik antikor temelli ticari testler mevcuttur. İmmünolojik testler için başlıca iki gereksinim vardır. Birincisi, yüksek kalitede antikorlar, diğeri ise metodolojidir. Düşük molekül ağırlıklı oldukları için aflatoksinler, antikor üretimi için bağışıklık sistemini uyarmazlar. Bu nedenle, önce daha büyük bir taşıyıcı moleküle konjuge olmaları gerekir. Taşıyıcı molekül olarak en yaygın kullanılan protein, bovin serum albuminidir. İmmünokimyasal analiz yöntemlerinin başlıca üç türü bulunmaktadır: İmmünoafinite kolon test (ICA), radyoimmün test (RIA) ve enzim-bağlantılı immünosorbent test (ELISA). Aflatoksin tespiti amacıyla bunların arasından en yaygın kullanılanı, basitliği, duyarlılığı ve uyumluluğu nedeniyle ELISA'dır. ELISA, bir numunedeki aflatoksinin (antijenin) tespitini, aflatoksine spesifik antikorlar ve enzim işaretli bir toksin kullanarak yapar [Hussain, 2011].

1.7. Aflatoksijenik Küflerin ve Potansiyel Aflatoksin Oluşumunun Tespitinde Moleküler Yaklaşımlar

Tarımsal ürünlerde aflatoksin oluşma riskini elemine etmek için en önemli şartlardan biri, mikotoksijenik küf kontaminasyonunun tanımlanmasıdır. Aflatoksijenik küfün tespit edilmesi, genellikle geleneksel dilüsyon yöntemiyle kültür ortamına ekim yapılarak ya da immünolojik yöntemlerle yapılagelmiştir.

Geleneksel yöntemler, zaman alıcı ve masraflı olmalarının yanı sıra, yoğun emek, mikolojik uzmanlık ve beceri gerektirir. Aflatoksijenik küfleri tanımlamada immünolojik metotların kullanımı da, yanlış pozitifliklerle karşılaşma ve numunelerin saflaştırılmasının gerekli bir ön koşul olması gibi sınırlamalara sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, farklı ortam koşulları altında fungusların mikotoksin üretme kabiliyetlerinin tanımlanmasının, mikotoksin üreten türlerin oluşturduğu riskin belirlenmesi için daha iyi bir indikatör olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle farklı ortam koşulları altında spesifik mikotoksin biyosentez genlerinin ekspresyonu ile fenotipik olarak mikotoksin üretimi arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla bazı çalışmalar yapılmıştır. Yine ekofizyolojik şartlar ile gen ekspresyonu ve fenotipik toksin üretimi arasındaki korelasyonun belirlenmesi amacıyla da çeşitli araştırmalar yapılmıştır [Schmidt-Heydt ve ark., 2007; Schmidt-Heydt ve ark. 2009; Geisen ve Schmidt-Heydt, 2009; Jurado ve ark. 2010].

Bu araştırmalarda, genellikle gen ekspresyon düzeylerinde oluşan küçük değişikliklerin hassas bir şekilde ve kantitatif olarak tespitine imkan veren gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) tekniği kullanılmıştır. Son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) dayalı yöntemler, hızlı, duyarlı ve spesifik bir yöntem olması nedeni ile gıda analizleri alanında yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Hücre içerisinde bulunan DNA molekülünün istenen bir bölgesinin hücre dışında uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanan metot, 1984 yılında ABD'de Mullis ve ark. tarafından geliştirilmiştir. PZR, çift zincirli DNA molekülünün iki zinciri birbirine bağlı tutan hidrojen bağlarının ısıl işlemle birbirinden ayrılması, çoğaltılması istenen hedef DNA bölgesinin iki ucuna spesifik iki oligonükleotidin yapışması ve oluşan zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması olmak üzere üç temel adımdan oluşan bir döngünün birbiri ardına gerçekleştiği reaksiyon olarak tanımlanabilir [Aran, 2010] [84]. Hedef sekansın in vitro amplifikasyonuna olanak sağlayan PZR temelli yöntemler, hızlı, hassas ve çok amaçlı olmalarının yanında, tespit edilecek organizmaların kültüre edilmesine gereksinim olmaması ve hedef DNA'nın kompleks bir karışımda bile tespit edilebilmesi gibi avantajlara da sahiptir [Manonmani ve ark., 2005].

Klasik PZR ile yapılan çalışmalar, aflatoksijenik *Aspergillus* türleri veya aflatoksin üretiminden sorumlu genler hakkında yalnızca kalitatif sonuçlar verebilmektedir. Oysa bir gıda ürünündeki aflatoksin oluşma riskinin belirlenmesi ve önlem alınması için kantitatif sonuçlara gereksinim vardır. Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif olarak sonuç verebilen GZ-PZR yöntemi, pek çok alanda olduğu gibi gıda analizlerinde de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Araştırmacılar, GZ-PZR tekniğinin kantitasyona imkan sağlamasının yanında, geniş bir dinamik aralığa sahip olması, düşük kontaminasyon riski taşıması ve daha spesifik bir teşhise imkan sağlaması nedeniyle klasik PZR'ye kıyasla oldukça avantajlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir [Mackay, 2004].

Aflatoksin üreten türlerin erken teşhisi ve miktarlarının tespit edilebilmesi için uygun moleküler metot geliştirmek amacıyla yürütülen bir çalışmada [Rodríguez ve ark., 2012a], genellikle gıda maddelerinde bulunduğu rapor edilen aflatoksin üreten ve üretmeyen farklı türleri temsil eden 24'ü *Aspergillus* spp. olan 53 adet küf suşu

seçilmiştir. 25°C'de 15 gün Malt Extract Agar (MEA)'da geliştirilen suşlarda aflatoksin analizi, 25°C'de 4 gün geliştirilen suşlardan DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. DNA numuneleri ile hem geleneksel PZR hem de ayrı ayrı SYBR Green ve Taqman ile GZ-PZR kurulmuştur. Aflatoksin üreten küflerin miktarını belirlemek için GZ-PZR protokollerinin yeterliliği, yapay olarak inokülasyon yapılan farklı gıdalarda (un, yer fıstığı, ceviz, baharat ve kuru fermente sucuk gibi) değerlendirilmiştir. Önerilen metotlar, gıdalardaki fungal yükü yüksek etkinlikte kantifiye ettiğinden, gıda maddelerinde aflatoksin üreten küflerin miktarını belirlemek amacıyla kullanmak üzere önerilmiştir.

Aflatoksin biyosentez yolundaki genlerin ekspresyonu analiz edilerek, bu genlerin aktivasyonu üzerine ekofizyolojik faktörlerin etkilerinin tespit edilebileceği gösterilmiştir. Schmidt-Heydt ve Geisen (2007), mikrodizilim ve GZ-PZR tekniklerini kullanarak okratoksin, trikotesenler ve aflatoksin gibi mikotoksinlerin biyosentezinden sorumlu gen kümelerinin ekspresyonu üzerine sıcaklık, su aktivitesi ve pH gibi fiziksel faktörlerin etkisini incelemişlerdir. Yine Schmidt-Heydt ve ark. (2008), *A. parasiticus*'un da dahil olduğu birçok küf türünde mikotoksin biyosentez genlerinin ekspresyonu üzerine sıcaklık ve su aktivitesinin etkisini belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar daha sonra yaptıkları bir çalışmada ise, her iki parametrenin *A. flavus*'un AFB_1 üretimi ve aflatoksin biyosentez genlerinin ekspresyonu üzerine etkisini incelemişlerdir [Schmidt-Heydt ve ark. 2009]. Passone ve ark. (2010), depolanan yer fıstığı örneklerinde potansiyel aflatoksin üreticisi olan Flavi populasyonunu belirlemek amacıyla GZ-PZR sistemini kullanarak *nor-1* genini kantitatif olarak analiz etmişlerdir. Yine çiğ fıstıklarda, depolama sürecinde potansiyel aflatoksin oluşum riskini tahmin etmeye yönelik bir çalışma yürütülmüştür [Abdel-Hadi ve ark., 2010]. Bunun için, 6 hafta süreyle 3 su aktivitesi düzeyinde (0.95, 0.90 ve 0.85 a_w) muhafaza edilen yapay olarak *A. flavus* ile kontamine edilmiş fıstıklarda, üç yapısal genin, *nor-1* (*aflD*), *ver-1* (*aflM*) ve *omtA* (*aflP*) ekspresyonu ve aflatoksin biyosentez metabolik yolunun düzenleyici geni *aflR* analiz edilmiş, ayrıca numunelerde küf konsantrasyonu ve aflatoksin miktarı da belirlenmiştir. Çalışma sonunda, test edilen üç a_w düzeyinde *nor-1* gen ekspresyonu ile aflatoksin oluşumu arasında önemli farklılıklar bulunurken, 1-3. haftalar arasında 0.90 a_w'de 0.95 a_w'ye kıyasla daha yüksek oranda ekpresyon gerçekleşmiştir. Buna karşılık, en düşük su aktivitesinde (0.85 a_w) çok düşük *nor-1*

ekspresyonu meydana geldiği, en yüksek AFB_1 üretiminin ise, 0.90 ve 0.95 a_w'de 3-6. haftalar sürecinde olduğu görülmüştür.

Diğer taraftan aflatoksin biyosentez yolundaki genlerin, toksin üreten ve üretmeyen fungal suşları birbirinden ayırmak amacıyla da kullanılabileceği bildirilmiştir. Öğütülmüş kırmızıbiber, pul biber ve mısırın model ürünler olarak kullanıldığı bir çalışmada, aflatoksin biyosentez metabolik yolunun *nor-1* geni kopya sayısı, GZ-PZR sistemi ile tespit edilerek aflatoksijenik *A. flavus* suşunun kantitatif belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışma sonunda, *nor-1* geninin kopya sayısı ile küfün koloni oluşturan birim (kob) sayısı arasında yüksek bir korelasyon olduğu gözlenmiştir [Mayer ve ark., 2003]. Diğer taraftan Scherm ve ark. (2005), aflatoksin üreten ve üretmeyen *A. flavus* ve *A. parasiticus* izolatlarını ayırt etmek için ters transkripsiyon-PZR (RT-PZR) kullanılarak *aflD, aflO* ve *aflP* genlerinin analiz edilmesinin uygun olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda, Yeast Extract Sucrose (YES) ve Yeast Extract Peptone (YEP) besi ortamlarında geliştirilen 10 *A. flavus* ve 3 *A. parasiticus* izolatının ürettikleri aflatoksin değerleri ile, *aflD, aflO* ve *aflP* genlerinin ekspresyon profillerinin arasında tutarlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Sardiñas ve ark. (2011), türe spesifik primerler kullanarak GZ-PZR yöntemi ile buğday unu örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerini diğer küf türlerinden ayırabilmişlerdir.

Pakistan'da depolanan buğdaylardan izole edilen 157 *A. flavus* ve 36 *A. parasiticus* suşu, multipleks PZR ve kültürel yöntemle aflatoksijenik ve aflatoksijenik olmayanlar şeklinde kategorize edilmiştir. Ayrıca, kontamine edilen buğdaylar 3 nem seviyesinde 3 farklı sıcaklıkta planlanan 9 farklı ortam koşulunda 5 ay boyunca depolanarak ELISA ve PZR analizleri ile aylık olarak aflatoksin ve aflotoksijenik gen varlığı yönünden izlenmiştir. Çalışma sonunda, test edilen izolatlar içinde sadece bir *A. parasiticus* izolatında *aflR, nor-1, ver-1* ve *omt* genleri tespit edilirken, aflatoksijenik olarak bilinen *A. flavus* suşlarının da bu 4 geni taşıdığı PZR deneyleri ile doğrulanmıştır [Rashid ve ark., 2008].

1.8. Gıdalarda Aflatoksin Seviyesi İçin Yasal Düzenlemeler

1960'ların başında aflatoksinlerin karsinojen etkili toksik küf metabolitleri olduğunun anlaşılması, gıdalarda aflatoksin seviyesi için yasal düzenleme yapılması gereğini ortaya koymuştur. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 1969'da tüm gıdalar ve yemler için

aflatoksin seviyesini 20 ppb ile sınırlandırmıştır. Ancak, 1970'li ve 1980'li yıllarda yürütülen hayvan besleme çalışmaları, 20 ppb üzerindeki aflatoksin seviyelerinde yemlerle beslenen hayvanlarda ve bu hayvanların ürünlerini kullanan tüketicilerde herhangi bir sağlık riski olmadığını göstermiştir. FDA, bu bilimsel çalışmalara dayanarak 1982'de, 1989'da ve 1990'da, sığır, domuz ve kümes hayvanları için yem katkısı olan pamuk tohumu küspesinde, mısırda ve yer fıstığında, aflatoksin önlem seviyesini 300 ppb olarak belirlemiştir. Daha sonra yapılan düzenlemelerle, damızlık sığır ve domuz ile anaç kümes hayvanlarının beslenmesi amaçlı kullanılan mısır ve yer fıstığı ürünlerinde aflatoksin seviyesini 100 ppb, damızlık olmayanlar hariç diğer hayvanların beslenmesi amaçlı kullanılan mısır, yer fıstığı ve diğer hayvan yemlerinde ve yem katkılarında ise aflatoksin seviyesini 20 ppb olarak değiştirmiştir [Anonymous, 2014c]. Ancak, ABD Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nün dünya genelinde yaptığı bir çalışma, 13 ülkede mikotoksinlerle ilgili hiçbir yasal düzenleme bulunmadığını, 77 ülkenin mikotoksinler konusunda spesifik yasal düzenlemelere sahip olduğunu göstermiştir. Avrupa Birliği ise, ilk olarak 1998'de bazı gıdalar için maksimum aflatoksin seviyelerini bildirmiştir. 2003'de, Gıda Katkı Maddeleri ve Bulaşanları Kodeks Komitesi'nde, badem, fındık ve fıstıklar için maksimum aflatoksin seviyeleri ile ilgili bir tartışma başlamış ve bu ürünler için maksimum toplam aflatoksin düzeyi 4 µg/kg olarak belirlenmiştir. 2006'da daha kapsamlı olarak gıdalar için toplam aflatoksin ve AFB_1 maksimum seviyelerini gösteren bir komisyon düzenlemesi (EC No 1881/2006) yayımlanmıştır. Daha sonra 2010'da, gıdalar için toplam aflatoksin ve AFB_1'in maksimum seviyelerinde tadil (EC No 165/2010) yapılmıştır.

Türkiye'de, ilk defa, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından 2002 yılında yayınlanarak yürürlüğe giren Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ (2002/63)'de gıda maddelerinde maksimum aflatoksin seviyeleri belirlenmiştir. Daha sonra, 2008 yılında yayınlanan Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ (2008/26) ile ilk yayınlanan tebliğde bazı değişiklikler yapılmıştır. Son olarak, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın, 29.12.2011 tarihinde yayınladığı Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği ile Avrupa Birliği'nin mikotoksinlerle ilgili yasal düzenlemesine tamamen uyum sağlanmıştır. Buna göre, AFB_1 için kabul edilebilir en yüksek değer 8 µg/kg, toplam aflatoksin için kabul edilebilir en yüksek değer 15 µg/kg'dır. Baharatlarda ise,

maksimum AFB_1 limiti 5 µg/kg, toplam aflatoksin limiti ise 10 µg/kg'dır [Anonim, 2011].

1.9. Kırmızıbiberlerde Toksijenik Küf Kontaminasyonu ve Aflatoksin Sorunu

Kırmızıbiber üretimi, genel olarak hasat, taşıma, meyve yüzeyinin yıkanması, tohumların uzaklaştırılması, kurutma, öğütme, paketleme ve depolama aşamalarından oluşmaktadır. Bu aşamalarda, ortam sıcaklık ve nemine bağlı olarak ürün, küf kontaminasyonuna ve aflatoksin oluşumuna duyarlıdır [Set ve Erkmen, 2010]. Nitekim potansiyel aflatoksin tehlikesine karşı tüm kırmızıbiber üretim sürecinin değerlendirildiği bir çalışmada, kurutma, depolama, taşıma, işleme, paketleme ve son depolama aşamaları, tehlike analizi yapılması gereken kritik kontrol noktaları olarak belirlenmiştir [Yalçın, 2008].

Türkiye'de farklı bölgelerde yürütülen araştırmalarda, kırmızıbiberlerdeki aflatoksin riskini doğrulayan sonuçlar alınmıştır. Bunun yanında, yurt dışında yapılan çalışmalarda da, hem baharatlarda hem kırmızıbiberlerde küf kontaminasyonunun ve aflatoksin sorununun önemi ortaya konmuştur.

Golge ve ark. (2013), Türkiye'de Adana ve Osmaniye illerinde piyasadan toplanan 182 kırmızıbiber numunesinde aflatoksin kontaminasyonunu incelemişler ve 150 numunede (%82.4) aflatoksin tespit etmişlerdir. Aflatoksin pozitif 150 numunenin 150'sinde 0.24-165 ppb arasında AFB_1, 84'ünde 0.15-11.3 ppb arasında AFB_2, 32'sinde 0.15-3.88 arasında AFG_1 tespit edilirken, hiçbir numunede AFG_2'ye rastlanmamıştır.

Özbey ve Kabak (2012), Ankara ve Çorum'da piyasadan temin edilen pulbiber, kırmızıbiber, karabiber, kimyon ve tarçından oluşan toplam 105 baharat numunesini aflatoksin ve okratoksin yönünden incelemişlerdir. Araştırma sonunda, 24 pulbiber numunesinin %79.2'sinde 0.13-11.45 µg/kg arasında, 22 kırmızıbiber numunesinin %63.9'unda 0.20-35.77 µg/kg arasında AFB_1 tespit edilmiştir.

İstanbul'da perakende satış yerlerinden toplam 100 kırmızıbiber numunesinde yapılan çalışmada, 68 numunenin 0.025-40.9 ppb düzeyinde AFB_1 ile kontamine olduğu [Aydın ve ark., 2007], 30'u kırmızıbiber olmak üzere toplam 84 baharatta yapılan çalışmada ise 36 baharatın (%42.9) 0.3-46.8 ppb düzeyinde toplam aflatoksin içerdiği [Colak ve ark., 2006] görülmüştür. Aydın'da 30 kırmızıbiber numunesinin tamamının, 15 pul biber

numunesinin ise %90'ının aflatoksinle kontamine olduğu, kırmızıbiberlerin %27'sinin, pul biberlerin ise %63'ünün 10 ppb toplam aflatoksin yasal limitini aştığı belirlenmiştir [Bircan, 2005]. Tekirdağ ilinde tüketime sunulan kırmızı pul biberlerden alınan 79 adet numunenin 70'inde AFB_1 belirlenmiştir [Dıraman ve Arıcı, 1999]. Numunelerin yaklaşık %50'sinin aflatoksin değerlerinin 4-100 ppb arasında değişmesi ve 2 adet örneğin de 100 ppb'yi geçmiş olması, bu ürünler için aflatoksin sorununun ciddiyetini ortaya koymaktadır. Şanlıurfa'da 70 kırmızıbiber numunesinin *Aspergillus, Penicillium* ve *Rhizopus* küf türleri ile kontamine olduğu kültürel yöntemle teşhis edilirken, numunelerin %17.1'inde 1.1-97.5 ppb arasında toplam aflatoksin olduğu TLC yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir [Erdogan, 2004]. Van'da 40 adet pul biber numunesinin tamamının değişik düzeylerde (1.1-44.0 ppb) AFB_1 içerdiği [Ağaoğlu, 1999], Bursa'da analize alınan 30 kırmızıbiberin ise 14'ünün (%46.7) 5-25 ppb arasında AFB_1 ile kontamine olduğu [Dokuzlu, 2001] bildirilmiştir. 2004 yılında Kayseri piyasasından toplanan 50 kırmızıbiber numunesinde ELISA yöntemiyle aflatoksin analizi yapılmış ve %6'sı 5 ppb üzerinde olmak üzere, tamamında 1.48-70.05 ppb arasında AFB_1 saptanmıştır [Kanbur ve ark., 2006]. Türkiye'nin değişik şehirlerinden toplanan 49 kırmızıbiber numunesinde TLC ile yapılan aflatoksin analizi sonuçlarına göre, kırmızıbiberlerde %24.5 oranında 3.5-80 ppb düzeyinde AFB_1, %22 oranında 3-60 ppb düzeyinde AFB_2, %10 oranında 8-40 ppb düzeyinde AFG_1 tespit edilirken, sadece 1 numunede 20 ppb AFG_2'ye rastlanmıştır [Demircioğlu ve Filazi, 2010].

Kırmızıbiber depolama sürecinde mikotoksin riskinin ambalaja bağımlı olarak değişebildiğini göstermeyi hedefleyen bir araştırmada, vakum altında ve hermetik paketlenmiş kırmızıbiberlerle, hasır çuvallarda açıkta muhafaza edilen biberlerin aflatoksin düzeyleri ve bazı mikrobiyolojik kalite parametreleri değerlendirilmiştir. Altı ay vakum altında ve hermetik paketlerde depolanan kırmızıbiberlerin toplam aflatoksin değerleri 0.5 μg/kg'dan daha az bulunurken, açık olarak depolanan kontrol numunelerinde 1.56 μg/kg AFB_1 ve 1.79 μg/kg toplam aflatoksin tespit edilmiştir [Duman, 2010]. Ayrıca, Gaziantep'te perakende satış yapılan mekanlardan iki ayrı dönemde 120 adet kırmızıbiber numunesi toplanarak ambalajlı ve ambalajsız olarak tasnif edilmiştir. HPLC ile yürütülen analiz sonuçları, sırasıyla sonbahar ve kış dönemlerinde olmak üzere ambalajsız kırmızıbiber numunelerinde, %24.3 ve %11.1 oranında 10 ppb limitini aşan toplam aflatoksin olduğunu, ambalajlı numunelerin

toplam aflatoksin değerinin ise limitler altında kaldığını ortaya koymuştur [Set ve Erkmen, 2010].

Katar'da yerel pazarlardan toplanan ve her biri farklı tür olan 14 baharat numunesinde, HPLC ile aflatoksin analizi ve kültürel yöntemle küf sayımı yapılmıştır. İzole edilen 120 fungal izolattan 92'sinin *Aspergillus* spp. olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, analize alınan baharatlar içinde en yüksek aflatoksin konsantrasyonuna (71.01 ppb) ve en yüksek küf sayısına (1280 kob/g) sahip baharatın kırmızı biber olduğu sonucunu varılmıştır [Hammami ve ark., 2014].

Sri Lanka'dan 86 ve Belçika'dan 35 olmak üzere piyasadan temin edilen toplam 121 kırmızıbiber numunesi, tüm mikotoksin varlığı yönünden analiz edilmiş ve 86 kırmızıbiber numunesinden %87'sinin, 35 kırmızıbiber numunesinin ise %63'ünün en az bir mikotoksinle kontamine olduğu anlaşılmıştır [Yogendrarajah ve ark., 2014]. Sri Lanka numunelerinin %67'sinin ve Belçika numunelerinin ise % 31'inin 5 μg/kg'nın üzerinde AFB_1 içerdiği belirlenmiş ve sonuçta tüm numunelerdeki en baskın mikotoksin türünün AFB_1 olması, araştırmanın önemli bulgusu olmuştur.

Fas'ın farklı bölgelerinde piyasadan eşit sayılarda kırmızıbiber, karabiber, beyaz biber ve kimyondan oluşan toplam 80 baharat numunesi toplanarak numunelerin fungal floraları karakterize edilmiş ve toksijenik potansiyelleri araştırılmıştır. Araştırma sonuçları, baharatlar içinde en yüksek fungal kontaminasyonun kırmızıbiberlerde olduğunu ve toplam fungal floranın %85'den fazlasını *Aspergillus* türü küflerin oluşturduğunu ve elde edilen toplam 63 fungal izolattan 36'sının aflatoksijenik olduğunu göstermiştir. Aflatoksin analiz sonuçları ise, kırmızı biber örneklerinin %95'inin 1.1-15.4 ppb arasında AFB_1 içerdiğini ortaya koymuştur [El Mahgubi ve ark., 2013].

Sardinas ve ark. (2011), piyasadan toplanan 62 pulbiber, 31 kırmızıbiber numunesini toksijenik *Aspergillus* türü varlığı yönünden incelemişler ve pulbiber ve kırmızıbiberlerde sırasıyla, %83.9 ve %64.5 oranında toksijenik küf kontaminasyonu tespit etmişlerdir. Tüm numunelerde en yaygın *Aspergillus* türü olarak, %67.7 oranında *A. niger* ve %49.5 oranında *A. flavus* tanımlamışlardır. Ayrıca, bu küf türlerini, daha düşük sıklıkta *A. carbonarius, A. parasiticus* ve *A. steynii*'nin izlediğini ifade etmişlerdir.

Pakistan'da, hem pazarlardan hem de restoranlardan temin edilen 63 toz kırmızıbiber ve 57 pulbiber numunesinde yapılan araştırmada, pazarlardan alınan toz kırmızıbiberlerin %56'sında, pulbiberlerin ise %59'unda, restoranlardan alınan toz kırmızıbiberlerin %58'inde, pulbiberlerin ise %54'ünde aflatoksin tespit edilmiştir [Iqbal ve ark., 2013]. Bu araştırmada, toz kırmızıbiber numunelerinin yaklaşık %38'inde, pulbiber numunelerinin ise yaklaşık %30'unda AFB_1 miktarının 10 µg/kg üzerinde olduğuna dikkat çekilmiştir.

Malezya'da 80 kırmızıbiber numunesinde kromatografik yöntemle aflatoksin ve okratoksin A analizi yapılmıştır [Jalili ve Jinap, 2012]. Araştırma sonuçları, numunelerin %65'inde 0.2-79.7 ng/g toplam aflatoksin bulunduğunu ve %15'inde aflatoksin miktarının 5 ng/g üzerinde olduğunu göstermiştir.

Santos ve ark. (2010), İspanya'da farklı yerlerden topladıkları 17 pulbiber, 11 toz kırmızıbiber ve 4 tütsülenmiş biber olmak üzere 32 numunede dört mikotoksin varlığını incelemişlerdir. Araştırma sonuçları, tüm numunelerde aflatoksin ve okratoksin A kontaminasyonu olduğunu ortaya koymuştur. Pulbiberlerde <100 ve $1.3x10^5$ kob/g arasında, kırmızıbiberlerde ise <100 ve $4.6x10^4$ kob/g arasında fungal yük tespit edilmiştir. Aynı zamanda, moleküler yöntemle tamamı *Aspergillus* spp. olarak tanımlanan 197 küf izolatının %31.5'inin *A. flavus* olduğu doğrulanmıştır.

Iqbal ve ark. (2011), *Capsicum annuum* L. cinsine ait 3 baharatlık kırmızıbiber türü ile aflatoksin kontaminasyonu arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek için bir araştırma yapmışlardır. Sonuçta, acılığı en keskin olan ve "Wonder Hot" olarak bilinen türün en düşük aflatoksin konsantrasyonuna sahip olduğunu, diğer iki tür ("Longi" ve "Skyline 1") arasında aflatoksin kontaminasyonu açısından istatistiksel olarak belirgin bir fark olmadığını ortaya koymuşlardır.

Pulbiber ve kırmızıbiber numunelerinde, aflatoksin, okratoksin ve zearalenon mikotoksinlerinin birlikte bulunma durumunu ortaya koymak için yapılan bir çalışmada, 64 pulbiber ve 35 kırmızıbiber analize alınmıştır [Santos ve ark., 2010]. Sonuçta, pulbiber numunelerinin %75'inin, kırmızıbiber numunelerinin ise %65'inin birden fazla mikotoksinle kontamine olduğu ve pulbiberlerin %59'unda, kırmızıbiberlerin %40'ında aflatoksin saptandığı ifade edilmiştir.

1.10. Toksijenik Küf ve Mikotoksin Oluşumunun Matematiksel Modelleme İle İfade Edilmesi

Deneysel çalışmaların ortak amacı, çalışılan bağımsız değişkenler ve sistemin yanıtı (tepkisi) arasındaki ilişkinin belirlenmesidir. Ancak, mühendislik ve diğer bilim alanlarında, çok sayıda bağımsız değişken olması ve her bir bağımsız değişken için deneysel çalışma yapmanın zaman, pratik ve ekonomik nedenlerle imkansız olması, bu ilişkiyi belirlemek için matematiksel modellemelerin kullanılmasını zorunlu hale getirmiştir.

Bağımsız değişkenler $(x_1, x_2, \dots, x_k)$ ile bağımlı bir değişken (y) arasındaki ilişkiyi gösteren modele regresyon modeli denilmektedir. Eğer modelde birden fazla bağımsız değişken veya yüksek dereceden terimler mevcutsa model çoklu regresyon modeli olarak adlandırılır. Çoklu regresyon modelinin genel hali şu şekildedir:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k} \sum_{\substack{j=1 \\ i \neq j}}^{k} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon$$

k: Bağımsız değişken sayısı

x_i: Bağımsız değişken değeri

y: Yanıt değeri

β_0: Model sabiti

$\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$: Değişken katsayıları

ϵ: Rassal hata

Yanıtı bir doğru ile ifade etmek her zaman mümkün olmayabilir. Bu nedenle, doğrusal bir yüzey ya da eğrisel bir yüzey yanıtı ifade etmek için daha uygun olabilir. İkinci durumda birden fazla bağımsız değişken, onların interaksiyonları ve yüksek dereceden etkileri mevcut olduğunda yanıt, bir eğrisel yüzey olarak karşımıza çıkar. Bu durumda oluşturulan modellere yanıt yüzey modeli denilmektedir. Yanıt Yüzey Metodu (YYM) ise yanıtı iyileştirmek ve optimize etmek için kullanılan bir grup istatistiksel ve matematiksel teknikten oluşur.

YYM, pek çok alanda olduğu gibi, gıda bilimi alanında da yaygın olarak kullanılan bir matematiksel modelleme metodudur. İlk olarak 1951 yılında Box ve Wilson tarafından tanımlanan metot, 1990'lı yıllardan itibaren, tıp, kimya, ziraat ve gıda dahil pek çok alanda kullanılmaktadır. Günümüzde, Minitab, SPSS, JMP, Design Expert gibi çeşitli hazır paket programlar bu metodu uygulayabilmektedir.

Birden fazla faktörün dolayısıyla değişkenin yer aldığı deneylerde, faktöriyel tasarımlar kullanılmalıdır. Bir faktöriyel deneyde, faktörlerin seviyelerinin bütün kombinasyonları test edilir. Örneğin, k tane faktörün ve her faktöründe incelenmesi gereken 2 seviyesinin olduğunu tasarlamışsak, 2^k tane farklı deneme düzeni oluşur. Eğer elimizde A, B ve C olmak üzere 3 faktör ve her faktörün sırasıyla a, b ve c seviyesi mevcutsa axbxc tane farklı deneme düzeni oluşur.

Varyans analizi, verideki değişkenliği verinin alt gruplarına bölüştürülerek incelenmesidir. Varyans analizi tablosu, faktörlerin seviyeleri arasında farklılık olup olmadığı, dolayısıyla yanıt üzerinde faktörün önemli etkisi olup olmadığı hakkında bilgi verir. Bu amaçla F-testi kullanır. Ayrıca varyans analizi tablosu çoklu regresyon modelinin uygunluğu hakkında da bilgi verir. Bu bilgi "Model" satırından okunabilir. Burada test edilen hipotez şu şekildedir:

$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \cdots = \beta_k = 0$

H_1: En az bir $\beta_j \neq 0$

H_0 hipotezinin red edilmesi en az bir bağımsız değişkenin modele önemli derecede katkı sağladığını gösterir [Hines and Montgomery, 1990].

YYM ile model oluşturulduktan sonra, bu modelin veriye uygunluğu mutlaka araştırılmalıdır. Bu amaçla, en çok yararlanılan istatistiksel analiz yöntemleri, determinasyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş determinasyon katsayısı (R^2_{adj}), tahminlenmiş determinasyon katsayısı (R^2_{pred}), artıklar (residuals), varyasyon katsayısı (CV), tahminlenmiş artık hata kareler toplamı (PRESS) ve uyum eksikliği gibi parametrelerin değerlendirilmesidir.

Determinasyon katsayısı (R^2), yanıttaki (y) varyasyonun ne kadarının model tarafından, dolayısıyla modelin tahminleyicileri (terimleri) tarafından açıklanabildiğini gösterir. Bu,

varyasyonun $1.0 - R^2$'lik kısmının modelde mevcut olan tahminleyiciler tarafından açıklanamadığı anlamına gelir. Ayrıca, deneyde bu yanıtları almamıza sebep olan başka bağımsız faktörlerin mevcut olduğu, ancak bunların modelde belirtilmediği düşünülebilir. Bununla birlikte, R^2'nin çok yüksek bir değere sahip olması "iyi bir regresyon modeline" sahip olunduğu anlamına gelmez. Modele istatistikî olarak önemli ya da önemsiz herhangi bir değişken ya da tahminleyici eklemek, daima R^2'yi yükseltir. Bir model yüksek R^2 değerine sahip olsa bile, kötü tahminler yapabilir. R^2_{adj}, örneklem sayısı ve modeldeki terim sayısına göre ayarlandığından, model uygunluğunu belirlemede daha anlamlıdır. R^2_{pred} ise, yeni gözlemlerde modelin yanıtı ne kadar iyi tahminleyeceğinin göstergesidir [Hines ve Montgomery, 1990].

Artık, yanıtın grup ortalamasından sapmasıdır. Bütün yanıt artıklarının orijinden geçen düz bir çizgi üzerinde dağılması beklenir. Öyle değilse, normal dağılım kabul edilmesinde problemler olacaktır. PRESS, R^2_{pred} gibi modelin tahminleme yeteneğini ölçer. Minitab, R^2_{pred} hesaplamak için PRESS değerini kullanır [Hines ve Montgomery, 1990].

Gıdalarda küf gelişiminin önceden önlenmesini esas alan yöntemlerin kullanımı, risk yönetiminde önemli bir adımdır. Bu nedenle, çevresel şartlara bağımlı olarak küflerin gelişimi, metabolit üretimi ve inaktivasyonu konularında prediktif mikrobiyolojinin kullanıldığı ve matematiksel modellemelerin yapıldığı bazı çalışmalar [Molina ve Giannuzzi, 2002; Pardo ve ark., 2005; Samapundo ve ark., 2007; Marin ve ark., 2009; Mousa ve ark., 2011; Astoreca ve ark., 2012; Marin ve ark., 2012] mevcuttur.

Arjantin'de, *A. parasiticus*'un aflatoksin üretimine sıcaklık, pH ve propiyonik asit konsantrasyonunun etkisinin, lineer olmayan matematiksel bir model kullanılarak değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır. Test edilen faktörlerin katı besiyeri ortamında aflatoksin üretimine etkilerinin kantitatif olarak belirlenebilmesi için bir matematiksel eşitlik geliştirilmiş ve aflatoksin oluşumunun inhibisyonu için optimum şartlar tespit edilmiştir [Molina ve Giannuzzi, 2002]. Pardo ve ark. (2005), fungal infeksiyon için ideal şartların belirlenmesi amacıyla, *A. ochraceus*'un okratoksijenik üç suşunun yeşil kahve içeren bir besi ortamında su aktivitesi ve sıcaklığa bağlı olarak gelişme verileri kullanılarak lineer olmayan bir regresyon yardımıyla matematiksel bir model oluşturmuşlardır. *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un mısırda gelişimine su aktivitesi ve

sıcaklığın hem ayrı ayrı hem de interaksiyon etkilerini önceden tahmin etmeyi hedefleyen bir çalışmada da, iki model karşılaştırmalı olarak ele alınmış ve mısırlara fungal kontaminasyonun önlenmesi için matematiksel modellerin kullanılabileceği gösterilmiştir [Samapundo ve ark., 2007].

Kırmızıbiberden izole edilen ve aflatoksijenik olduğu kanıtlanan iki *A. flavus* suşunun %3 kırmızıbiber içeren katı besiyerinde koloni gelişimi ve ergosterol oluşumu izlenmiş ve her iki parametre için elde edilen veriler arasında lineer bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Test edilen suşların lag fazının tahmininde farklı modellerin kullanımının sağladığı yararlar değerlendirilmiştir. Kinetik modeller, fungal gelişim oranı ve lag fazı konusunda önceden tahmin yapmaya yardım ederken, Rosso cardinal modelinin depolama sürecinde ortamda kullanılabilir su miktarı ile küf gelişme hızı ve lag fazı arasındaki bağlantıyı ortaya koymak için uygun bir model olduğu gösterilmiştir [Marin ve ark., 2009]. Mousa ve ark. (2011), *A. flavus*'un pirinçte gelişmesini ve aflatoksin üretimini, su aktivitesi ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak tanımlayan kinetik bir model geliştirmek amacıyla Rosso, Davey ve polinomiyal olmak üzere üç adet ikinci derece matematiksel model denemişlerdir. Arjantin'de mısırdan izole edilen üç *A. flavus* suşunun gelişme hızına sıcaklık ve su aktivitesinin birleştirilmiş etkilerini değerlendirmek üzere gelişme limitlerini modellemek için bir olasılık yaklaşımı kullanılmış, izolat, ortam, su aktivitesi ve sıcaklık olmak üzere dört faktör denemeye alınarak tam faktöriyel bir tasarım yapılmıştır [Astoreca ve ark., 2012]. Benzer bir çalışmada ise, fıstıklarda *A. flavus* tarafından üretilen aflatoksini ve küf gelişimini, nem içeriği ve depolama sıcaklıklarının bir fonksiyonu olarak önceden tahmin etmek için de, tam faktöriyel tasarım kullanılmış, %10, 15, 20, 25 ve 30 nem seviyelerinde ve 10, 15, 20, 25, 30, 37 ve 42°C sıcaklıklarda suşun gelişimi için hem kinetik hem de olasılık modelleri oluşturulmuştur [Marin ve ark., 2012].

Türkiye'de ve dünyada yapılan çok sayıda çalışma, kırmızıbiberlerde *A. flavus* kontaminasyonunun ve aflatoksinin kayda değer bir sorun olduğunu göstermiştir. Üstelik kırmızıbiber gıda endüstrisinde pek çok ürünün girdisi durumunda olduğu için, *A. flavus* ve aflatoksin içeren kırmızıbiberler, bu ürünlerde de dolaylı olarak risk oluşturmaktadır. Bu nedenle, kırmızıbiberlerde, farklı su aktivitesi ve sıcaklık koşullarında *A. flavus*'un gelişme ve aflatoksin üretme sürecinin, aflatoksin üretiminde rol oynayan bazı genlerin (*aflR*, *nor-1* ve *pksA*) ekspresyon düzeyleri ile birlikte

izlenmesi hedeflenmiştir. Bugüne kadar, literatürde kırmızıbiberlerde aflatoksin üretim mekanizmasını, su aktivitesi, sıcaklık ve zamana bağlı olarak, kültürel, analitik ve moleküler yöntemlerle karşılaştırmalı olarak inceleyen başka bir çalışma yapılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada, farklı su aktivitesi (0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95) ve sıcaklık (5, 15, 25 ve 35°C) koşullarında, 20 gün boyunca kırmızıbiberlerde *A. flavus*'un gelişimi, aflatoksin üretimi ve *aflR, nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının izlenerek, faktörlerin analiz edilen her bir yanıta etkilerinin belirlenmesi ve nihayet aflatoksin üretimi üzerine tüm faktörlerin etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Böylece, literatürdeki boşluğun doldurulması, kırmızıbiberlerde aflatoksin üretim mekanizmasının aydınlatılması ve sorununun çözümüne yönelik veriler elde edilmesi düşünülmüştür.

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Materyal

2.1.1. Kırmızıbiber

Bu çalışmada, analiz materyali olan toz kırmızıbiber, ülkemizdeki kırmızıbiber üretiminin büyük bir kısmının gerçekleştirildiği Gaziantep ilinin Islahiye ilçesinde faaliyet gösteren bir firmadan temin edilmiştir.

2.1.2. Fungal Suşlar

Kırmızıbiber numunelerini kontamine etmek için, ABD Tarım Bakanlığı'na bağlı Tarımsal Araştırma Servisi'nden sağlanan aflatoksijenik NRRL 3357 *A. flavus* suşu kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kırmızıbiber Numunelerinin Ön Hazırlığı

Kırmızıbiber numuneleri, otoklavda (Hirayama HV-110, Japonya) 121±1°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Steril toz kırmızıbiber numuneleri, daha önce kuru hava sterilizatöründe (Nüve FN 500, Türkiye) steril edilen cam numune kaplarına 0.01 g hassasiyette analitik terazide (Precisa XB 3200C, İsviçre) 40'ar g tartılarak günlük analiz numuneleri oluşturulmuştur.

Sterilizasyon öncesi ve sonrası, kırmızıbiber numunelerinden küf sayımı ve toplam aflatoksin analizleri için numuneler alınmıştır. İki tekrar olmak üzere yapılan analiz sonuçlarına göre, çalışma materyali olarak kullanılan kırmızıbiber numunelerinde küf olmadığı ve tespit edilir düzeyde aflatoksin bulunmadığı doğrulanmıştır.

2.2.2. Kırmızıbiber Numunelerinin Su Aktivitelerinin Ayarlanması

Numunelerde hedef su aktivitesi (a_w) seviyesini sağlamak üzere eklenmesi gerekli su miktarını tam olarak belirlemek için bir ön çalışma yapılmıştır. Bu ön çalışmada, değişen miktarlarda su içeren kırmızıbiber numuneleri hazırlanmış ve iyice homojen hale getirilip 24 saat bekletildikten sonra su aktivitesi tayin cihazı (AquaLab Series3, ABD) ile a_w ölçümleri yapılmıştır. Bu veriler ışığında, 0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95 a_w'ye sahip kırmızıbiber numuneleri elde etmek için 100 g kırmızıbibere sırasıyla 13.5, 31.0, 45.0 ve 69.0 mL su ilave edilmesi gerektiği bulunmuştur.

2.2.3. Kırmızıbiber Numunelerinin Depolanma Ortamları İçin Gliserol:Su Karışımlarının Hazırlanması

Bu çalışmada, 4 farklı su aktivitesine ayarlanan ve fungal spor süspansiyonu inoküle edilen kırmızıbiberler, 4 farklı sıcaklıkta 20 gün süreyle depolanmıştır. Bu süreçte, kırmızıbiber numunelerinin ayarlanan su aktivitelerinde optimum seviyede dengede kalmaları amacıyla, depolanma ortamlarında kullanılmak üzere gliserol (Merck) ve su karışımları kullanılmıştır. 0.80, 0.85 0.90 ve 0.95 a_w'ye ayarlı numuneleri depolamak için sırasıyla, 1:0.85, 1:1.25, 1:2 ve 1:4.5 gliserol:su (w:w) karışımları hazırlanmıştır.

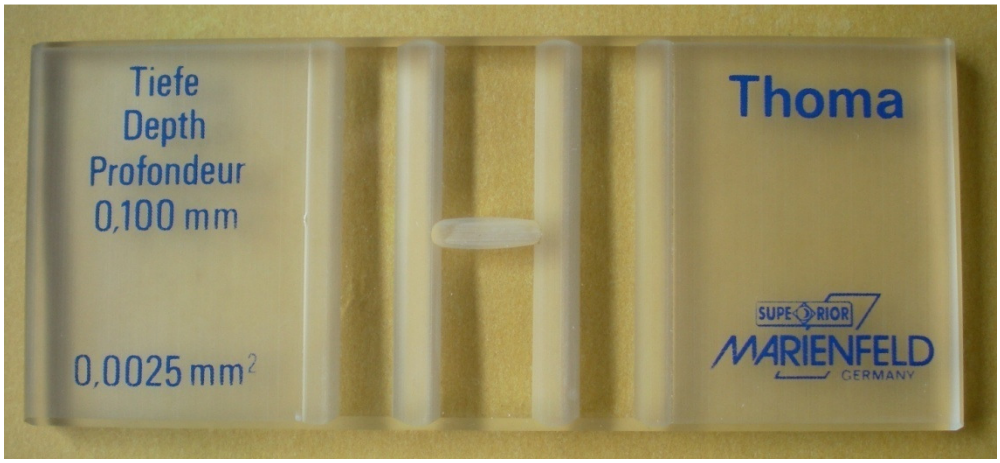
2.2.4. Fungal Suşların Geliştirilmesi

Fungal suşlar, Sabouraud Dextrose Broth (Lab M) içinde canlandırıldıktan sonra, tüplerde yatık olarak hazırlanan Malt Extract Agar (Merck) besiyerlerine ekim yapılmış ve 25±1°C'de inkübatörde (Binder KB115, Almanya) 7 gün süreyle kültüre edilmiştir.

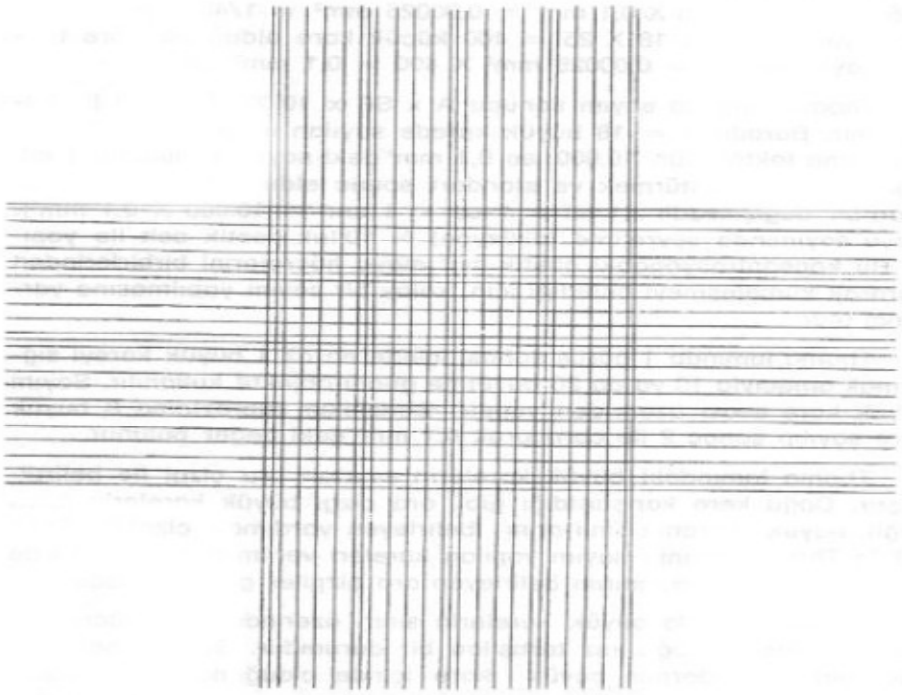
2.2.5. Fungal Spor Süspansiyonunun Hazırlanması ve Fungal Spor Sayımı

İnkübasyon süresi sonunda, %0.5 Tween 80 (Merck) içeren tamponlu peptonlu su (Merck) eklenen fungal kültürlerin yüzeyi steril öze ile dikkatli bir şekilde karıştırılarak sporların sıvıya geçmesi sağlanmış ve spor süspansiyonu steril bir şişede toplanmıştır. Elde edilen bu süspansiyonun konsantrasyonu, Thoma lamı yardımıyla belirlenmiştir [Gürgün ve Halkman, 1990]. Bu amaçla, Thoma lamı (Şekil 2.1) üzerindeki çizgili alana (Şekil 2.2) homojen spor süspansiyonu damlatılmış ve üzerine Thoma lameli kapatıldıktan sonra, 40x objektifli mikroskop (Zeiss Axio Imager 2, Almanya) tablası üzerine yerleştirilerek toplam 16 büyük karede fungal sporlar sayılmıştır. Şekil 2.3'de, Thoma lamına damlatılmış fungal sporların 40x objektifli mikroskoptaki görüntüsü verilmiştir. Thoma lamında, toplam sayım hacmi 0.1 mm^3 olduğundan, 16 büyük

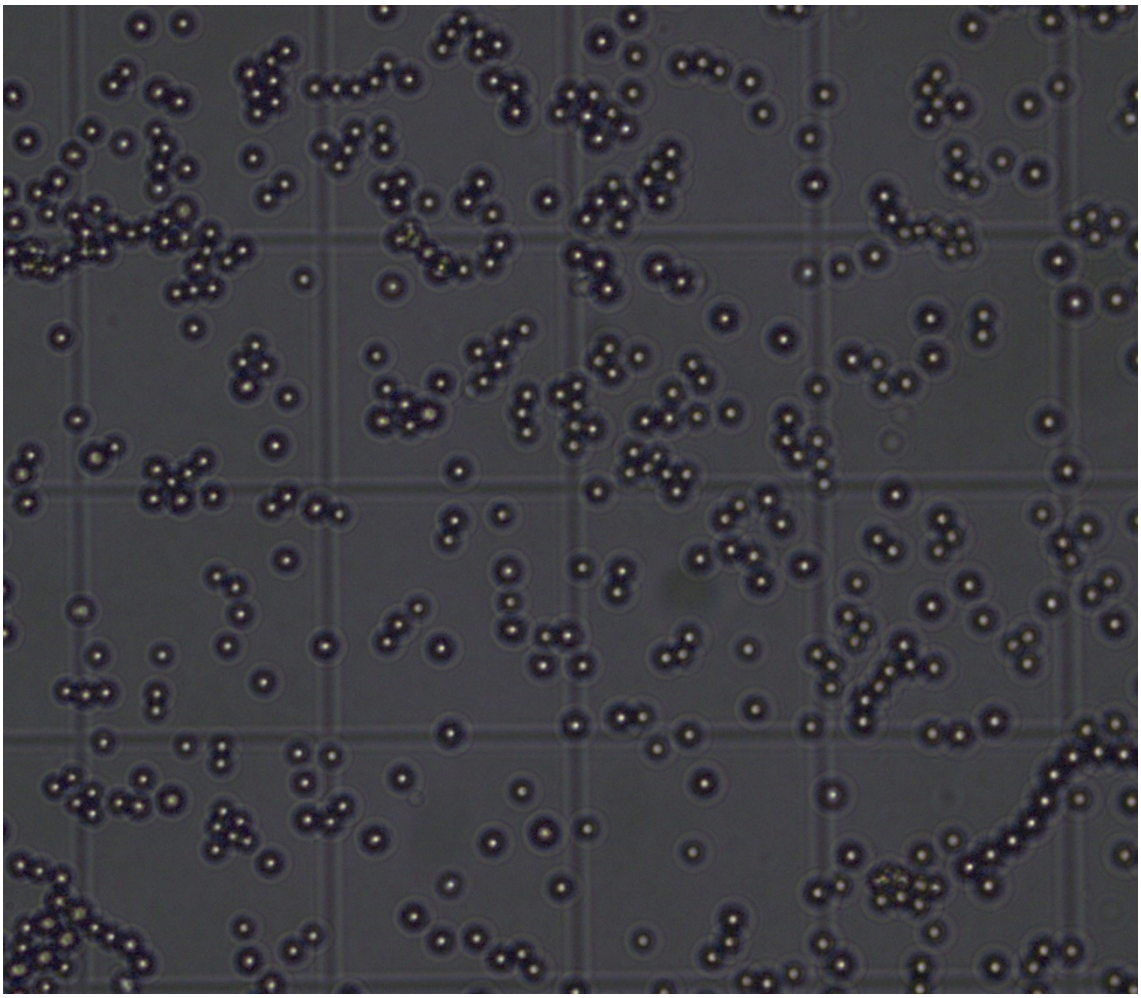
karedeki spor sayısı 10000 ile çarpılarak 1 cm^3 (1 mL) süspansiyondaki spor sayısı hesaplanmıştır. Kırmızıbiber numunelerinin inokülasyonunda kullanılan spor süspansiyonlarının tamamı 10^6 spor/mL olarak hazırlanmıştır.



Şekil 2.1. Thoma Lamı



Şekil 2.2. Thoma Lamında Sayım Yapılan Çizgili Alan



Şekil 2.3. Fungal Sporların Thoma Lamında 40x Objektifte Büyütülmüş Mikroskop Görüntüsü

2.2.6. Kırmızıbiberlere Fungal Spor Süspansiyonunun İnokülasyonu ve Depolanması

Numune kaplarına tartılmış kırmızıbiberler, su aktiviteleri ayarlandıktan 24 saat sonra, yeniden a_w ölçümleri yapılarak kontrol edildikten sonra, fungal spor süspansiyonu ile %2 düzeyinde inoküle edilmiş ve spatül yardımıyla kırmızıbiber ve fungal sporların tamamen karışması sağlanmıştır. Numune kapları kapaksız olarak, içlerinde gliserol:su karışımı bulunan kapaklı plastik saklama kutularına (Şekil 2.4) yerleştirilmiş ve 5, 15, 25 ve 35°C'de, 20 gün süreyle inkübe edilmiştir.

İnokülasyonun 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 ve 20. günlerinde, plastik saklama kutularına yerleştirilmiş olan numuneler alınarak, küf sayımı, toplam aflatoksin tayini ve RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Daha sonra, ekstrakte edilen RNA ile ters transkripsiyon GZ-PZR kurulmuş ve aflatoksin biyosensentezini düzenleme geni *aflR* ile aflatoksin

biyosentez metabolik yolu yapısal genleri *nor-1* ve *pksA* ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir.

Şekil 2.4. Kırmızıbiberlerin İçine Yerleştirildiği ve İnkübasyona Bırakıldığı Kapaklı Plastik Saklama Kutusu

2.2.7. Kırmızıbiber Numunelerinde Küf Sayımı

10 g kırmızıbiber numunesi, 0.01 g hassasiyette tartım yapan terazi (Sartorius GM 512 0CE, Almanya) ile filtreli steril torbaya tartılmış ve üzerine 90 mL Maximum Recovery Diluent (MRD) (Merck) eklenerek karıştırıcı (Masticator Basic 400, İspanya) yardımıyla 30 saniye homojenize edilmiştir. Hazırlanan bu 10^{-1} dilüsyondan, diğer seri dilüsyonlar hazırlandıktan sonra, Aspergillus Differentiation Agar (AFPA) (Fluka) ve Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) (Merck) besiyerleri içeren petrilere uygun dilüsyonlardan yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler, 25±1ºC'deki soğutmalı inkübatörde (Nüve ES 120, Türkiye) 4 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan küf kolonileri sayılmış ve ekim yapılan dilüsyon katsayıları ve dilüsyon miktarları dikkate alınarak numunelerdeki toplam küf miktarları kob/g olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel analizlerde, ortalama sayım sonuçlarının 10 tabanına göre logaritmaları kullanılmıştır.

2.2.8. Kırmızıbiber NumunelerindeToplam Aflatoksin Tayini

Toplam aflatoksin tayini için, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Agilent 1200, ABD) cihazı ve floresan dedektör (FLD) kullanılarak minör modifikasyonlarla AOAC yöntemleri uygulanmıştır [AOAC, 2000; AOAC 2005].

Poliolefin malzemeden yapılmış 175x300 mm ebatlarında numune karıştırıcı torbası içine analitik terazide (Sartorius GM 512 0CE, Almanya) 0.01 g hassasiyette 25 g kırmızıbiber numunesi tartılmıştır. Numune üzerine 2.5 g sodyum klorür (NaCl) (Merck) ve 150 mL 8:2 (v:v) metanol (Sigma-Aldrich) ve su karışımı eklenerek 90 saniye pedallı karıştırıcıda (Masticator Basic 400, İspanya) karıştırılmıştır. Karışım filtre kağıdından (Whatman No:4) süzülerek filtrat, 250 mL'lik erlende toplanmıştır. İmmunoafinite kolonlar (R-Biopharm Aflaprep P07) kullanılmadan önce 10 mL fosfatlı tamponlanmış tuz (PBS) (Oxoid) tabletlerinden hazırlanan çözelti geçirilerek şartlandırılmıştır. Daha sonra, 60 mL PBS ve 10 mL filtrattan oluşan toplam 70 mL'lik ekstrakt karışımı, yaklaşık 2-3 mL/dakika hızda kolondan geçirilip 10 mL demineralize su ile kolon 2 kez yıkanmıştır. Kolondan PBS, PBS+filtrat ve demineralize su geçirme aşamalarında, vakum pompası (KNF-N 022 AN18, Almanya) ve vakum manifoldundan (Agilent VacElut 12 Manifold, ABD) oluşan bir düzenekten yararlanılmıştır. Bu işlemlerin ardından kolondan, 10 saniye süreyle negatif basınç oluşturmamaya dikkat ederek enjektör yardımıyla hava geçirilmiştir. En son 1.5 mL kromatografik saflıkta metanol (Sigma-Aldrich) ve 1.5 mL demineralize su kolondan geçirilerek toplam 3 mL aflatoksin ekstresi tüpte karıştırılmış ve HPLC viallerine alınmıştır.

HPLC mobil fazı, metanol:su (1:1) (v:v) karışımının her litresine, 120 mg potasyum bromür (Merck) ve 100 µL derişik nitrik asit (Merck) eklenerek hazırlanmıştır. Cihazın çalışma koşulları, pompa akış hızı 1 mL/dakika, detektör eksitasyon dalga boyu 360 nm, emisyon dalga boyu 430 nm, Kobra Cell akım kaynağı 100 µA olacak şekilde ayarlanmıştır.

Daha önce belirli konsantrasyonlarda hazırlanmış aflatoksin standart çözeltilerinin HPLC'de verdiği piklerin alıkonma sürelerinden elde edilen kromatogramlardan yararlanarak numunelerdeki aflatoksin miktarları ppb olarak tespit edilmiştir.

2.2.9. Kırmızıbiber Numunelerinden Toplam RNA Ekstraksiyonu

Toplam RNA ekstraksiyonu için, ticari RNA ekstraksiyon kiti (Qiagen Rneasy Plant Mini Kit) protokolünde [Anonymous, 2012] minör modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır.

2 g kırmızıbiber, analitik terazide tartıldıktan sonra (AND GR 200, ABD) doku parçalayıcının (Retsch MM400, Almanya) çelik haznelerine çelik bir bilye ile birlikte yerleştirilmiş ve 30 sn^{-1} frekansla, sıvı azot ve 500 mg polivinilpirolidon (PVP) (AppliChem) ile 2 dakika muamele edilmiştir. Böylece, sıvı azot yardımıyla hedef hücre duvarlarının yıkımı sağlanmış, PVP yardımıyla ise kırmızıbiberdeki fenolik ve alkoloidlerin kompleks oluşturması sağlanıp proteinlerle girişimde bulunması engellenmiştir. Daha sonra, RNA ekstraksiyonu yapılacak her bir numune için 2 adet olmak üzere, 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine 400'er mg parçalanmış numune tartılmıştır. Mikrosantrifüj tüplerindeki numune üzerine, %1 oranında 2-Merkaptoetanol (β-ME) (Merck) içeren 1200 µL RLT lizis tampon çözeltisi (Qiagen) eklenmiştir. Tüp içeriğinin vorteks (JeioTech VM-96B, Kore) yardımıyla iyice karışarak guanidintiyosiyanat içeren RLT tampon çözeltisi ile protein yapının denatüre olması ve β-ME ile disülfid bağlarının indirgenmesi sağlanmıştır. Lizis işleminin etkinliğini arttırmak için mikrosantrifüj tüpler, 56°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blok (Bioer HB-202, Çin) üzerinde 15 dakika inkübe edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpler, 15000 xg devirde 3 dakika santrifüjlenerek (Hettich Mikro 22 R, Almanya) mikrosantrifüj tüplerde lizatın ayrılması sağlanmıştır. Mikrosantrifüj tüpteki lizat, 2 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş bir QIA shredder spin kolona (Qiagen) aktarıldıktan sonra, spin kolonlar 30000 xg'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde oluşan süpernatant dikkatli bir şekilde yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış üzerine süpernatantın yarısı hacminde %99'luk etanol (Merck) eklenip pipetlenerek karıştırılmıştır. Bu karışım, 2 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirilen RNeasy spin kolona (Qiagen) aktarılmış ve 20000 xg'de 20 saniye santrifüj yapılmıştır. Karışım hacmi 700 µL'yi geçtiğinden aynı spin kolonda ardı ardına tüm karışım bitene kadar santrifüjleme yapılmış ve her santrifüj işleminden sonra spin kolonun altında toplanan sıvı kısım atılmıştır. Spin kolona, 700 µL RW1 yıkama tampon çözeltisi (Qiagen) ilave edilmiş ve 15000 xg'de 15 saniye santrifüj yapılıp akan sıvı faz atılmıştır. Spin kolon membranı, 1:4 oranında etanol eklenmiş 500 µL RPE yıkama tampon çözeltisi (Qiagen) ile toplam 3 kez

yıkanmış ve 2 yıkama sonrası 15000 xg'de 15 saniye santrifüj edilirken, son yıkama sonrası 15000 xg'de 2 dakika santrifüjlenerek spin kolon membranı etanolden tamamen arındırılmıştır. Spin kolon, akan sıvı faz ile temas ettirilmeden yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 32000 xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Son olarak, spin kolon 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek 40 µL RNaz içermeyen su eklenmiş, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 15000 xg'de 1 dakika santrifüjlenerek toplam RNA elüe edilmiştir. Elde edilen numune RNA'sının konsantrasyonu, nanodrop spektrofotometre (ACT Gene, UVS-99, ABD) ile ölçülüp daha sonra GZ-PZR'de kullanılmak üzere -80°C'de derin dondurucuda (Hettich HS 4486, Almanya) muhafaza edilmiştir.

2.2.10. GZ-PZR ile RNA Amplifikasyonu

Fungal spor süspansiyonu ile kontamine kırmızıbiber numunelerinden ekstrakte edilen toplam RNA numuneleri, floresan deteksiyon sistemi ile entegre edilmiş termal döngü cihazında, ters transkripsiyon GZ-PZR kiti (Qiagen QuantiFast SYBR Green RT-PCR) kullanılarak mRNA'dan cDNA oluşması sağlanmış ve hedef gen bölgeleri, spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir. Bu amaçla, öncelikle eşik floresan sinyal seviyesine ulaşmak için gerekli döngü sayısının bir ifadesi olan Cq değerleri tespit edilmiştir. Böylece, aflatoksin biyosentez metabolik yolunun düzenleyici geni *aflR* ve yapısal genlerden *nor-1* ve *pksA* genlerinin kantitatif ölçümü yapılmıştır.

Reaksiyonlar, ticari kit potokolü [Anonymous, 2011] esas alınarak Tablo 2.1'de verildiği gibi toplam reaksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde kurulmuştur. Tüm bileşenleri içeren PZR stripleri, çoklu spin santrifüjde (Biosan Multi Spin MSC 6000, Letonya) 2400 rpm devirde 15 saniye karıştırıldıktan sonra termal döngü cihazına (Roche LightCycler Nano, Almanya) yerleştirilmiştir. 50°C'de 25 dakika ters transkripsiyon ve 95°C'de 15 dakika ilk denatürasyonun ardından, 35 döngüden oluşan sıcaklık programı uygulanarak Tablo 2.2'de verilen GZ-PZR koşulları altında amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.1. Ters Transkripsiyon GZ-PZR Karışımının Bileşimi

Bileşen	**Hacim (µL)**
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix[(1)]	10
Primer A (İleri Primer)	0.15
Primer B (Geri Primer)	0.15
QuantiFast RT Mix[(2)]	0.2
RNaz içermeyen su	7.5
Kalıp RNA	2
Toplam Reaksiyon Hacmi	20

[(1)]: QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix İçeriği: HotStarTaq® *Plus* DNA Polymerase, QuantiFast SYBR Green RT-PCR Buffer, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), SYBR Green I floresan boya ve ROX™ pasif referans boya
[(2)]:QuantiFast RT Mix İçeriği: Rekombinant heterodimerik iki enzim (Omniscript® ReverseTranscriptase, Sensiscript® ReverseTranscriptase) karışımı

Tablo 2.2. Reaksiyon Karışımlarına Uygulanan GZ-PZR Koşulları

Aşama	**Süre**	**Sıcaklık**	**Döngü Sayısı**
Ters Transkripsiyon	25 dakika	50°C	1
İlk Aktivasyon Aşaması	15 dakika	95°C	1
Denatürasyon	5 saniye	95°C	35
Bağlanma	30 saniye	58°C/56°C*	
Uzama	40 saniye	72°C	

*: Bağlanma sıcaklığı, a*flR* ve *pksA* primerleri için 58°C, *nor-1* primeri için 56°C olarak uygulanmıştır.

Analize alınan kırmızıbiber numunelerinden ekstrakte edilen RNA'larda GZ-PZR ile ekspresyon düzeyi belirlenen *aflR, nor-1* ve *pksA* genlerinin primer dizilimleri de Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Gen Dizilimleri

Primer	**Yön**	**Nükleotid Dizisi (5' → 3')**	**Uzunluk (baz çifti)**	**Referans**
aflR	İleri	AATACATGGTCTCCAAGCGG	352	Del Fiore ve ark., 2010
	Geri	GAAGACAGGGTGCTTTGCTC		
nortaq	İleri	GTCCAAGCAACAGGCCAAGT	66	Mayer ve ark., 2003
	Geri	TCGTGCATGTTGGTGATGGT		
pksA	İleri	CAGCAAGCTCGTGATCAGATT	101	Bu çalışma
	Geri	GCATTACATCGTTAGGACAACATCT		

2.2.11. Gen Kopya Sayılarının Belirlenmesi

Ters transkripsiyon GZ-PZR ile amplifiye edilen RNA'larda Cq değerleri tespit edilen her bir gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*), klonlama kiti (Invitrogen TA Cloning Kit) kullanılarak ayrı ayrı plazmid vektörlere aktarılmıştır. Bu aşamalarda, kit protokolü [Anonymous, 2004] minör modifikasyonlarla uygulanmıştır. Daha sonra, klonlama yapılan her bir geni içeren kompetent hücrenin farklı konsantrasyonlarından ekstrakte edilen DNA'larla kurulan GZ-PZR sonucu alınan Cq değerleri ile hücre konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren denklem elde edilmiş ve bu denklem yardımıyla söz konusu genlerin kopya sayıları belirlenmiştir.

Çalışmada *A. flavus* ile kontamine kırmızıbiberlerden ekstrakte edilen RNA numunelerinde, aflatoksin biyosentez metabolik yolunda yer alan genlerin kopya sayılarının belirlenmesine yönelik işlemler, temel olarak 5 aşamada gerçekleştirilmiştir: (1) Klonlanacak gen bölgelerini içeren primerlerle PZR ürünü hazırlanması; (2) PZR ürününün vektöre bağlanması (ligasyon); (3) Kompetent hücrenin hazırlanması; (4) Ligasyon ürününün kompetent hücreye aktarılması; (5) Klonlanan geni içeren kompetent hücrenin konsantrasyonu ile gen kopya sayısı arasındaki ilişkinin tespiti.

Klonlanacak Gen Bölgelerini İçeren Primerlerle PZR Ürünü Hazırlanması

Klonlanacak her bir gen bölgesini için ayrı ayrı olmak üzere, toplam reaksiyon hacmi 50 µL olan ve Tablo 2.4'te bileşenleri verilen karışımlar hazırlanmıştır. Reaksiyon

karışımlarına, termal döngü cihazında (Roche LightCycler Nano, Almanya), Tablo 2.5'te verilen PZR koşulları uygulanmış ve PZR ürünü elde edilmiştir.

Her bir gen bölgesi için ayrı ayrı gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda elde edilen PZR ürünleri, 0.75 µg/mL etidyum bromür içeren %1.5'luk agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

Tablo 2.4. Klonlama İçin Hazırlanan PZR Karışımı

Bileşen	**Hacim (µL)**
10X PCR Buffer (1)	5
Primer A (İleri Primer) (2)	0.5
Primer B (Geri Primer) (2)	0.5
50 mM dNTPs (3)	0.5
Taq Polymerase (1 unit/µL)	2
Steril su	39.5
Kalıp DNA (100 ng)	2
Toplam Reaksiyon Hacmi	50

(1): 10X PCR Buffer İçeriği: 100 mM Tris-HCl pH:8.3 (42°C'de), 1 mM EDTA, 500 mM KCl, 25 mM $MgCl_2$, %0.01 Jelatin
(2): Klonlanan her bir gen bölgesi için Tablo 2.3'te verilen ileri ve geri primerler kullanılmıştır.
(3): 50 mM dNTPs İçeriği: 12.5 mM dATP, 12.5 mM dCTP, 12.5 mM dGTP, 12.5 mM dTTP, pH: 8.0

Tablo 2.5. Klonlama İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımına Uygulanan PZR Koşulları

Aşama	**Süre**	**Sıcaklık**	**Döngü Sayısı**
İlk Aktivasyon Aşaması	5 dakika	95	1
Denatürasyon	30 saniye	95°C	30
Bağlanma	25 saniye	58°C/56°C*	
Uzama	40 saniye	72°C	
Son Uzama	5 dakika	72°C	1

*: Bağlanma sıcaklığı, *aflR* ve *pksA* primerleri için 58°C, *nortaq* primeri için 56°C olarak uygulanmıştır.

PZR Ürününün Vektöre Bağlanması (Ligasyon)

Ticari klonlama kiti TA Cloning (Invitrogen) içinde bulunan vektör, ligaz enzimi, ligasyon tamponu ve elde edilen PZR ürünü kullanılarak Tablo 2.6'da verilen bileşimde ligasyon reaksiyonu karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan ligasyon reaksiyonu karışımı, 14°C'ye ayarlı inkübatörde (Nüve ES 120, Türkiye) 1 gece inkübe edilmiştir.

Tablo 2.6. Klonlama İçin Ligasyon Reaksiyonu Karışımı

Bileşen	Hacim (µL)
Taze PZR ürünü (10 ng/µL)	1
Vektör (pCR®2.1) (25 ng/µL) (1)	2
10X Ligasyon Tamponu (2)	1
T4 DNA Ligaz	1
Steril su	5
Toplam Reaksiyon Hacmi	10

(1): Vektör (pCR®2.1) İçeriği: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH: 8.0
(2): 10X Ligasyon Tamponu İçeriği: 60 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, mg/mL sığır serum albumini, 70 mM β-merkaptoetanol, 1 mM ATP, 20 mM dithiothreitol, 10 mM spermidine

Kompetent Hücrenin Hazırlanması

Kompetent hücre olarak, rutin klonlama prosedürleri için laboratuvar ortamında geliştirilmiş ve yüksek transformasyon etkinliğine sahip *Escherichia coli* DH5-α suşu (MAX Efficiency® Invitrogen) seçilmiştir.

Daha önce hazırlanıp steril edilen ve tüplere 4'er mL dağıtılan Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerine (%1 g Tryptone, %0.5 g Yeast Extract, %1 g NaCl, pH:7.0) 24 saatlik taze *E. coli* DH5-α kültüründen ekim yapılarak 37°C'ye ayarlı orbital çalkalayıcılı inkübatörde (IKA KS 4000i, Almanya) 18 saat inkübe edilmiştir. 18 saatlik *E. coli* DH5-α kültüründen hazırlanan 1:9 oranındaki kültür:steril distile su karışımı kuvars spektrofotometre küvetine alınmış ve yine 1:9 oranında hazırlanan suş içermeyen LB sıvı besiyeri:steril distile su karışımının tanık çözelti olarak kullanıldığı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700, Japonya) 600 nm dalga boyunda absorbansı (A) ölçülmüştür. Beklenen 0.45-0.55 arasındaki absorbans değeri alınana kadar,

inkübasyon süresi uzatılmıştır. Steril 50 mL'lik Falkon tüpünde bulunan 30 mL LB sıvı besiyerine 3/(10xA) işleminden elde edilen mL hacim kadar *E. coli* DH5-α kültürü ilave edilmiştir. Ekim yapılan Falkon tüpü, 37±1ºC'deki inkübatörde (Memmert IN 110, Almanya) 1-2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bir saatlik inkübasyon sonunda elde edilen *E. coli* DH5-α kültüründen hazırlanan 1:9 oranındaki kültür:steril distile su karışımı, yeniden kuvars spektrofotometre küvetine alınmış ve yine 1:9 oranında hazırlanan ve suş içermeyen LB sıvı besiyeri:steril distile su karışımının tanık çözelti olarak kullanıldığı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700, Japonya) 600 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. Absorbans değeri 0.045-0.055 aralığında bir değer okunana kadar 15 dakikada bir spektrofotometre ile ölçümler aynı şekilde tekrarlanmıştır. İstenen absorbans aralığına ulaşıldığında inkübasyon durdurulmuş ve kültür, 4°C'de 4400 devir/dakika hıza ayarlı santrifüjde (Hettich Mikro 200R, Almanya) 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 10 mL soğuk 100 mM kalsiyum klorür ($CaCl_2$) (Merck) ilave edilip tüpe hafif vurulmak suretiyle hücre çökeltisi çözündürülmüş ve kuru buz üzerinde 35-45 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda kültür, tekrar 4°C'de 4400 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant yine dikkatlice uzaklaştırılmış, hücre çökeltisi üzerine 2 mL soğuk 100 mM $CaCl_2$ eklenmiş ve tüpe hafif vurularak karışması ve hücre çökeltisinin çözünmesi sağlanmıştır. Buzdolabında 4°C'de 18 saat bekletilen kompetent hücre, 3 gün boyunca transformasyon için kullanılabilmiştir.

Ligasyon Ürününün Kompetent Hücreye Aktarılması

Buzdolabında 4°C'de muhafaza edilen kompetent hücreden 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne 200 µL alınmıştır. Üzerine, daha önce hazırlanan ligasyon reaksiyonu karışımından 7 µL ilave edilmiş ve buzdolabında 4°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Mikrosantrifüj tüp sarsılmadan 43°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blok üzerine alınarak 3 dakika ısıl şok yapılmıştır. Buzdolabında ve ısıtıcı blok üzerinde bekletme işlemleri tekrarlanarak, ikinci kez ısıl şok uygulanmıştır. Bundan sonra, hasar görmüş hücrelerin onarılması amacıyla kompetent hücre-ligasyon reaksiyonu karışımı üzerine 250 µL S.O.C. Medium (Invitrogen) ilave edilerek 225 devir/dakika ve 37°C'ye ayarlı orbital çalkalayıcılı inkübatörde 1 saat inkübe edilmiştir. Bu arada, LB agar (%1 g Tryptone, %0.5 g Yeast Extract, %1 g NaCl, %1.5 Agar, pH:7.0) hazırlanmış, sterilizasyon sonrası

besiyeri yaklaşık 55°C'ye geldiğinde 100 µg/mL oranında ampisilin (Gibco-Life Technologies) ilave edilerek petrilere dökülmüştür. Katılaşan besiyerleri, kullanılana kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. Transformasyon işleminin etkinliğini kontrol etmek için yapılan ekim işlemi öncesinde, hazırlanan LB agarların yüzeyine, önce 40 µL 40 mg/mL X-GAL (Sigma-Aldrich) solüsyonu, sonra 40 µL 100 mM IPTG (Sigma-Aldrich) solüsyonu yayılıp kuruması sağlanmıştır. Daha sonra LB petrilerine, mikrosantrifüjde S.O.C. Medium içinde bulunan transformasyon karışımından 100 µL ekim yapılmıştır. 37±1ºC'deki inkübatörde 18 saat inkübasyon sonrası, LB agar petrileri beyaz ve mavi koloni oluşumu yönüyle gözlenmiştir. Beyaz koloniler, içerisine hedef gen bölgesini almış vektörün aktarıldığı kompetent hücreler olarak yorumlanmıştır. Beyaz kolonilerden, LB agar petrilerine yeniden ekim yapılıp inkübe edilerek klonlanmış geni içeren kompetent hücre çoğaltılmış ve taze kültür elde edilmiştir.

Klonlanan Geni İçeren Kompetent Hücrenin Konsantrasyonu İle Gen Kopya Sayısı Arasındaki İlişkinin Tespiti

Klonlanan geni içeren kompetent hücrenin konsantrasyonu ile gen kopya sayısı arasındaki ilişkiyi bulmak üzere, öncelikle LB agarda üreyen koloniler, MRD içeren tüplere öze ile toplanıp homojenize edildikten sonra densitometre (Biomerieux, Fransa) yardımıyla bulanıklıkları ölçülerek 1 Mc Farland'a ayarlı stok hücre kültürleri oluşturulmuştur. Bu stok hücre kültürlerinden, MRD ile 1:9 oranında seyreltmeler yapılarak 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} ve 10^{-5} seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan hem LB agara ekimler yapılmış hem de DNA izolasyonu ve PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Ekim yapılan petriler, 37±1ºC'deki inkübatörde 18-24 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılmış ve dilüsyon katsayısı ile ekim hacmi dikkate alınarak klonlanmış geni içeren kompetent hücrenin ortamdaki konsantrasyonu kob/mL olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların 10 tabanına göre logaritmaları alınmıştır.

Ayrıca, klonlanmış geni içeren kompetent hücreden hazırlanan 1 Mc Farland stok çözelti ve bu çözeltiden hazırlanan seri dilüsyonlarından DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu, ticari DNA izolasyon kiti (Invitrogen PureLink Genomic DNA Kits) kullanılarak ve kit protokolünde [Anonymous, 2012b] bazı modifikasyonlar yapılarak yürütülmüştür.

Stok çözelti ve seri dilüsyonlardan mikrosantrifüj tüplere 200 µL alınıp üzerine 180 µL PureLink Genomic Digestion Buffer (Invitrogen) ve 20 µL Proteinase-K (Invitrogen) ilave edilmiş ve vorteks yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Karışım, ısıtıcı blok üzerinde, 56°C'de 1 saat ve ardından 75°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Lizatın oda sıcaklığına gelmesi için beklendikten sonra, 6000 xg devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpe aktarılmış ve önce 200 µL AL Buffer (Invitrogen), sonra 200 µL %99'luk soğuk etanol (Merck) eklenip vortekslenmiştir. Homojenize karışım, bir toplama tüpüne yerleştirilmiş bulunan PureLink spin kolona (Invitrogen) aktarılmış ve 6000 xg devirde 1 dakika santrifüjlenmiştir. Kolona, önce 500 µL Wash Buffer 1 (Invitrogen) ilave edilip 6000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmiş, sonra 500 µL Wash Buffer 2 (Invitrogen) ilave edilip 20000 xg'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolon, oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika kurumaya bırakılmıştır. Kolona 50 µL PureLink Genomic Elution Buffer (Invitrogen) eklenip 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20000 xg'de 2 dakika santrifüjlenerek elüsyon yapılmıştır.

İzole edilen DNA numuneleri ile ticari PZR kiti FastStart Essential DNA Green Master Kit (Roche) kullanılarak Tablo 2.7'de verildiği gibi reaksiyon karışımları hazırlanmış ve Tablo 2.8'de belirtilen şartlarda PZR gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.7. Klonlanmış Geni İçeren Kompetent Hücre DNA'sı İle Hazırlanan PZR Karışımı

Bileşen	**Hacim (µL)**
FastStart Essential DNA Green Master Mix [(1)]	10
Primer A (İleri Primer)	0.15
Primer B (Geri Primer)	0.15
DNA	2
DNaz içermeyen su	7.7
Toplam Reaksiyon Hacmi	20

[(1)]: FastStart Essential DNA Green Master Mix İçeriği: FastStart Taq DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mix (dTTP yerine dUTP içeren), SYBR Green I dye, $MgCl_2$

Klonlanmış aflatoksin genlerini içeren her bir kompetent hücreden ayrı ayrı yürütülen çalışmalar sonucu elde edilen, farklı hücre konsantrasyonlarının logaritmik değerleri ve kompetent hücre DNA'sı ile kurulan GZ-PZR sonucu elde edilen Cq değerleri

arasındaki ilişki, hazır bir program (CurveExpert 1.4) yardımıyla grafiksel olarak belirlenmiştir. Grafiklere ait denklemler, yine aynı program yardımıyla tanımlanabilmiş ve böylece GZ-PZR sonucu ulaşılan Cq değerleri, gen kopya sayısı olarak ifade edilebilmiştir.

Tablo 2.8. Klonlanmış Geni İçeren Kompetent Hücre DNA'sı İle Hazırlanan PZR Karışımına Uygulanan GZ-PZR Koşulları

Aşama	**Süre**	**Sıcaklık**	**Döngü Sayısı**
İlk Aktivasyon Aşaması	5 dakika	95	1
Denatürasyon	10 saniye	95°C	30
Bağlanma	10 saniye	58°C/56°C*	
Uzama	10 saniye	72°C	
Son Uzama	5 dakika	72°C	1

*: Bağlanma sıcaklığı, *aflR* ve *pksA* primerleri için 58°C, *nortaq* primeri için 56°C olarak uygulanmıştır.

2.2.12. Çalışma Verilerinin Modellenmesi ve İstatistiksel Analizler

Bu çalışma, tam faktöriyel deney tasarımı kullanılarak 2 tekerrür olarak yürütülmüştür. Çalışma, su aktivitesi (X_1), sıcaklık (X_2) ve zaman (X_3) olmak üzere 3 faktörlü olarak tasarlanmış olup su aktivitesi ve sıcaklık için 4'er seviye, zaman için 10 seviye mevcuttur. Buna göre, 4x4x10 (160) farklı deneme düzeni oluşturulmuştur. Her bir deneme düzeni için 2 tekerrür yürütüldüğünden, her bir yanıt için toplam 320 deney yapılmıştır.

Çalışma sürecinde kırmızıbiberlerde yapılan analizler sonunda, 5 yanıt ölçülmüştür. Bunlar, kültürel küf sayımları, AFB_1 miktarları, *aflR*, *nor-1* ve *pksA* genlerinin ekspresyon düzeyleridir. Faktörlerin farklı seviyelerinin ölçülen bu yanıtlar üzerindeki etkilerinin önemli olup olmadığı varyans analizi yapılarak incelenmiştir. Aynı zamanda, YYM ile modeller oluşturulmuş ve bunların uygunluğu da analiz edilmiştir.

Ayrıca, kırmızıbiberlerdeki aflatoksin miktarı ile aflatoksijenik *A. flavus*'un aflatoksin biyosentez metabolik yolunda rol alan genler arasındaki ilişkiler de, YYM ile modellenerek ortaya konmuştur. Bunun için, su aktivitesi (X_1), sıcaklık (X_2) ve zaman (X_3) faktörlerine ek olarak, kopya sayısı cinsinden *aflR* (X_4), *nor-1* (X_5) ve *pksA* (X_6) genlerinin ekspresyon düzeyleri de YYM ile modelde faktör olarak kullanılmıştır.

Tüm modelleme analizleri, Minitab 17 istatistik paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Modellerin istatistiksel olarak uygunluğu, bu program yardımıyla yapılan varyans analizi ve artık analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, IBM SPSS Statistics 20 istatistik programı ile Duncan testi yapılarak grupların ortalamaları karşılaştırılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

Bu çalışmada, 10^6 spor/mL konsantrasyonundaki aflatoksijenik NRRL 3357 *A. flavus* spor süspansiyonu ile %2 düzeyinde kontamine edilen kırmızıbiber numuneleri, 4 su aktivitesi (0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95) ve 4 sıcaklık (5, 15, 25 ve 35°C) kombinasyonundan oluşan 16 farklı koşulda 20 gün süreyle muhafaza edilmiş ve bu süreçte 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 ve 20. günlerde analizlere alınmıştır. Numunelerde, depolama süreci boyunca toplam 10 gün, kültürel yöntemle küf sayımları ve HPLC ile AFB_1 analizleri yapılmıştır. Aynı zamanda, numunelerden ekstrakte edilen toplam RNA kullanılarak GZ-PZR ile aflatoksin biyosentez metabolik yolunda rol oynayan 3 genin (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyon düzeyleri kantifiye edilerek logaritmik gen kopya sayıları bulunmuştur.

Çalışma, tam faktöriyel deney tasarımına uygun ve 2 tekerrür olarak yürütülmüştür. Çalışmada, 4 seviye su aktivitesi, 4 seviye sıcaklık ve 10 seviye zaman faktörlerinin NRRL 3357 *A. flavus* ile kontamine kırmızıbiberlerde küf sayısı, AFB_1 miktarı ve gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyonları üzerine tek tek ve interaksiyon etkilerini tespit etmek amacıyla varyans analizleri yapılmıştır. Bunun yanında, kırmızıbiberlerde NRRL 3357 *A. flavus* kontaminasyonu durumunda ve söz konusu su aktivitesi-sıcaklık-süre faktörleri ile birlikte, aflatoksin metabolik yolunun 3 geninin AFB_1 üretimi üzerine tek tek ve birleşik etkileri, yine varyans analizleri ile belirlenmiştir. Ayrıca, sıcaklık, su aktivitesi, zaman, gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyonu faktörlerinin AFB_1 üretimi ile ilişkisini belirleyebilmek için YYM kullanılarak modeller oluşturulmuş ve bu modellerin uygunluğu değerlendirilmiştir.

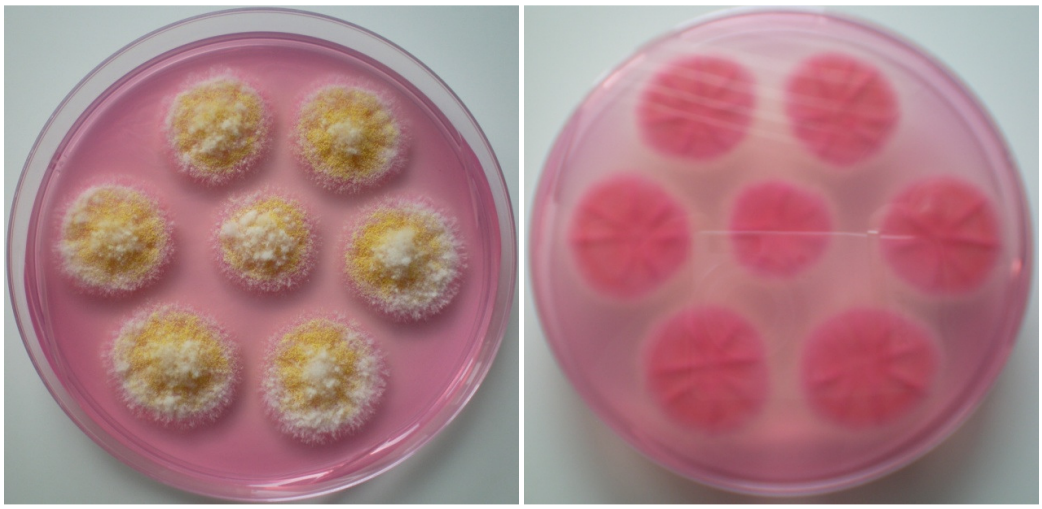
3.1. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki Küf Sayım Sonuçları

Çalışmada materyal olarak kullanılan kırmızıbiber numuneleri, kontaminasyondan önce küf sayımı yapılmak üzere kültürel ekime alınmış ve numunelerin tespit edilebilir düzeyde küf içermediği (<10 kob/g) doğrulanmıştır.

Kontamine kırmızıbiberlerden izole edilen küfler, NRRL 3357 *A. flavus* suşundan yapılan mikrobiyolojik ekim sonucu oluşan kolonilerle morfolojik ve mikromorfolojik olarak karşılaştırılmış ve araştırma sürecinde sayım yapılan kolonilerin *A. flavus* olduğu teyit edilmiştir.

Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de, kontamine kırmızıbiber numunelerinin mikrobiyolojik ekimi sonucu üreme görülen AFPA ve DRBC besiyelerinde *A. flavus*'un önden ve tersten görünümleri yer almaktadır.

Şekil 3.1. AFPA Besiyerinde *A. flavus*



Şekil 3.2. DRBC Besiyerinde *A. flavus*

AFPA ve DRBC besiyerlerinden izole edilen küf kolonileri ile preperatlar hazırlanarak mikroskopta 40x büyütmeli objektifle mikroskobik yapıları incelenmiştir (Şekil 3.3).

Şekil 3.3. *A. flavus*'un 40x Büyütmeli Objektifle Mikroskobik Görünümü

Kırmızıbiber numunelerinde küf sayımı için, AFPA ve DRBC olmak üzere 2 kültür ortamı kullanılmıştır. 0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95 a_w değerlerine ayarlı olarak 4 ayrı sıcaklıkta 20 gün boyunca inkübe edilen kontamine kırmızıbiberlerdeki *A. flavus* sayım sonuçları, sırasıyla Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde AFPA Besiyerinde *A. flavus* Sayım Sonuçları (log kob/g)*

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	Sıcaklık			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	5.13±0.08	5.13±0.08	5.13±0.08	5.13±0.08
	1	5.21±0.12	5.23±0.13	5.27±0.13	5.24±0.12
	2	5.33±0.18	5.35±0.33	5.27±0.33	5.32±0.23
	3	5.31±0.33	5.33±0.20	5.04±0.19	5.15±0.21
	4	5.25±0.28	5.16±0.16	4.89±0.13	4.84±0.21
	5	5.13±0.24	5.00±0.21	4.75±0.03	4.64±0.24
	7	4.98±0.13	4.85±0.07	4.00±0.33	4.36±0.24
	10	4.81±0.00	4.24±0.11	3.63±0.09	4.06±0.08
	15	4.59±0.04	3.86±0.10	3.02±0.11	3.20±0.05
	20	4.38±0.01	3.46±0.03	2.68±0.15	2.93±0.07
	Ortalama	5.01±0.35^{Aa}	4.76±0.66^{Bab}	4.37±0.94^{Cb}	4.49±0.82^{Bb}
0.85	0	5.13±0.08	5.13±0.08	5.13±0.08	5.13±0.08
	1	5.24±0.12	5.27±0.11	5.30±0.08	5.23±0.05
	2	5.37±0.20	5.35±0.16	5.42±0.16	5.33±0.03
	3	5.34±0.34	5.37±0.31	5.21±0.31	5.15±0.00
	4	5.24±0.31	5.16±0.16	5.03±0.25	5.08±0.07
	5	5.18±0.24	5.04±0.22	4.90±0.22	4.80±0.09
	7	5.10±0.20	4.83±0.09	4.93±0.08	4.75±0.02
	10	4.89±0.09	4.75±0.02	4.56±0.07	4.44±0.10
	15	4.68±0.02	4.31±0.03	4.38±0.09	4.23±0.09
	20	4.47±0.06	3.53±0.11	3.96±0.01	3.92±0.08
	Ortalama	5.06±0.34^{Aa}	4.87±0.57^{Ba}	4.88±0.46^{Ba}	4.81±0.45^{Ba}
0.90	0	5.19±0.07	5.19±0.07	5.19±0.07	5.19±0.07
	1	5.48±0.10	5.34±0.08	5.37±0.01	5.36±0.05
	2	5.50±0.05	5.35±0.07	5.49±0.03	5.47±0.06
	3	5.33±0.13	5.29±0.06	5.45±0.11	5.61±0.03
	4	5.18±0.25	5.11±0.09	5.63±0.05	5.76±0.02
	5	5.03±0.28	4.91±0.17	5.85±0.05	5.90±0.06
	7	4.93±0.34	4.80±0.20	5.95±0.08	6.03±0.05
	10	4.63±0.30	4.59±0.21	6.17±0.08	6.36±0.15
	15	4.54±0.24	4.23±0.32	6.37±0.05	6.98±0.01
	20	4.20±0.14	3.87±0.34	6.89±0.07	6.85±0.05
	Ortalama	5.00±0.46^{Ab}	4.87±0.51^{Bb}	5.84±0.50^{Aa}	5.95±0.01^{Aa}
0.95	0	5.19±0.07	5.19±0.07	5.19±0.07	5.19±0.07
	1	5.46±0.16	5.47±0.15	5.52±0.09	5.41±0.00
	2	5.55±0.04	5.59±0.03	5.64±0.09	5.51±0.03
	3	5.56±0.02	5.70±0.16	5.60±0.12	5.73±0.05
	4	5.42±0.08	5.53±0.03	5.91±0.19	5.98±0.04
	5	5.31±0.01	5.45±0.02	6.14±0.22	6.11±0.01
	7	5.34±0.30	5.56±0.21	6.22±0.11	6.41±0.00
	10	5.15±0.29	5.37±0.16	6.40±0.03	6.63±0.13
	15	4.96±0.15	5.47±0.07	6.57±0.04	7.40±0.03
	20	4.62±0.11	5.38±0.30	7.18±0.03	7.10±0.08
	Ortalama	5.26±0.32^{Ab}	5.47±0.20^{Ab}	6.04±0.57^{Aa}	6.15±0.70^{Aa}

*: Ortalama±standart sapma; A-C: Farklı harfler, aynı sütun için, o sütüna ait sıcaklık seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).; a-b: Farklı harfler, aynı satır için, o satıra ait su aktivitesi seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 3.2. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde DRBC Besiyerinde *A. flavus* Sayım Sonuçları (log kob/g)*

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	Sıcaklık			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	5.20±0.06	5.20±0.06	5.20±0.06	5.20±0.06
	1	5.25±0.11	5.25±0.13	5.26±0.13	5.31±0.14
	2	5.37±0.14	5.37±0.18	5.35±0.24	5.27±0.30
	3	5.31±0.34	5.37±0.32	5.11±0.19	5.13±0.19
	4	5.26±0.30	5.19±0.18	4.90±0.15	4.93±0.24
	5	5.18±0.27	5.05±0.12	4.68±0.11	4.70±0.25
	7	5.00±0.17	4.92±0.02	3.89±0.17	4.36±0.36
	10	4.84±0.08	4.19±0.04	3.69±0.09	4.05±0.38
	15	4.71±0.01	3.75±0.03	2.90±0.00	3.62±0.30
	20	4.41±0.02	3.45±0.11	2.43±0.18	2.60±0.52
	Ortalama	5.06±0.35^{ABa}	4.77±0.69^{Bab}	4.34±1.01^{Cb}	4.34±0.89^{Bb}
0.85	0	5.20±0.06	5.20±0.06	5.20±0.06	5.20±0.06
	1	5.25±0.15	5.29±0.11	5.30±0.11	5.25±0.09
	2	5.36±0.20	5.40±0.15	5.46±0.16	5.37±0.01
	3	5.37±0.31	5.38±0.30	5.27±0.25	5.16±0.01
	4	5.31±0.29	5.17±0.25	5.02±0.19	5.08±0.04
	5	5.20±0.25	5.06±0.16	4.94±0.25	4.86±0.07
	7	5.14±0.21	4.90±0.05	4.93±0.15	4.81±0.01
	10	4.99±0.13	4.74±0.06	4.65±0.05	4.48±0.03
	15	4.74±0.03	4.19±0.11	4.43±0.09	4.28±0.00
	20	4.54±0.04	3.61±0.11	4.08±0.00	4.01±0.03
	Ortalama	5.11±0.32^{Aa}	4.89±0.57^{Ba}	4.93±0.44^{Ba}	4.85±0.44^{Ba}
0.90	0	5.27±0.02	5.27±0.02	5.27±0.02	5.27±0.02
	1	5.34±0.08	5.29±0.09	5.40±0.04	5.36±0.02
	2	5.41±0.08	5.38±0.02	5.46±0.05	5.46±0.05
	3	5.33±0.05	5.30±0.11	5.41±0.07	5.72±0.07
	4	5.10±0.11	5.18±0.12	5.67±0.12	5.76±0.10
	5	4.91±0.17	4.94±0.23	5.81±0.09	5.87±0.16
	7	4.79±0.11	4.88±0.20	6.00±0.08	6.05±0.07
	10	4.24±0.10	4.65±0.32	6.19±0.12	6.38±0.22
	15	4.15±0.11	4.18±0.27	6.58±0.11	7.01±0.01
	20	4.02±0.31	3.87±0.39	7.01±0.01	6.88±0.03
	Ortalama	4.81±0.60^{Bb}	4.89±0.54^{Bb}	5.88±0.55^{Aa}	5.98±0.59^{Aa}
0.95	0	5.27±0.02	5.27±0.02	5.27±0.02	5.27±0.02
	1	5.54±0.09	5.57±0.07	5.52±0.11	5.45±0.03
	2	5.61±0.01	5.69±0.08	5.65±0.09	5.61±0.05
	3	5.65±0.08	5.76±0.17	5.60±0.15	5.84±0.05
	4	5.50±0.01	5.58±0.06	5.89±0.25	6.06±0.09
	5	5.38±0.02	5.62±0.10	6.14±0.28	6.22±0.04
	7	5.33±0.22	5.41±0.03	6.24±0.10	6.38±0.02
	10	5.09±0.13	5.31±0.01	6.41±0.01	6.84±0.36
	15	4.97±0.04	5.36±0.24	6.61±0.04	7.17±0.02
	20	4.78±0.10	5.37±0.32	7.23±0.09	7.02±0.07
	Ortalama	5.31±0.29^{Ab}	5.49±0.22^{Ab}	6.06±0.58^{Aa}	6.19±0.64^{Aa}

*: Ortalama±standart sapma; A-C: Farklı harfler, aynı sütun için, o sütüna ait sıcaklık seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).; a-b: Farklı harfler, aynı satır için, o satıra ait su aktivitesi seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın küf gelişimi üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.3'te verilmiştir. Tablo 3.3'te verilen tahminleyiciler verideki değişkenliğin yaklaşık %72'sini açıklayabilmiştir. Bu tabloda görüldüğü gibi, kırmızıbiberlerde küf gelişimi üzerine, su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın tek tek etkileri oldukça önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Faktörlerin interaksiyon etkilerine bakıldığında, su aktivitesinin, sıcaklığın ve zamanın kuadratik etkileri önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Su aktivitesi-sıcaklık, su aktivitesi-zaman, sıcaklık-zaman faktör kombinasyonlarının küf gelişimi üzerine etkileri ise oldukça önemli ($p<0.01$) bulunmuştur.

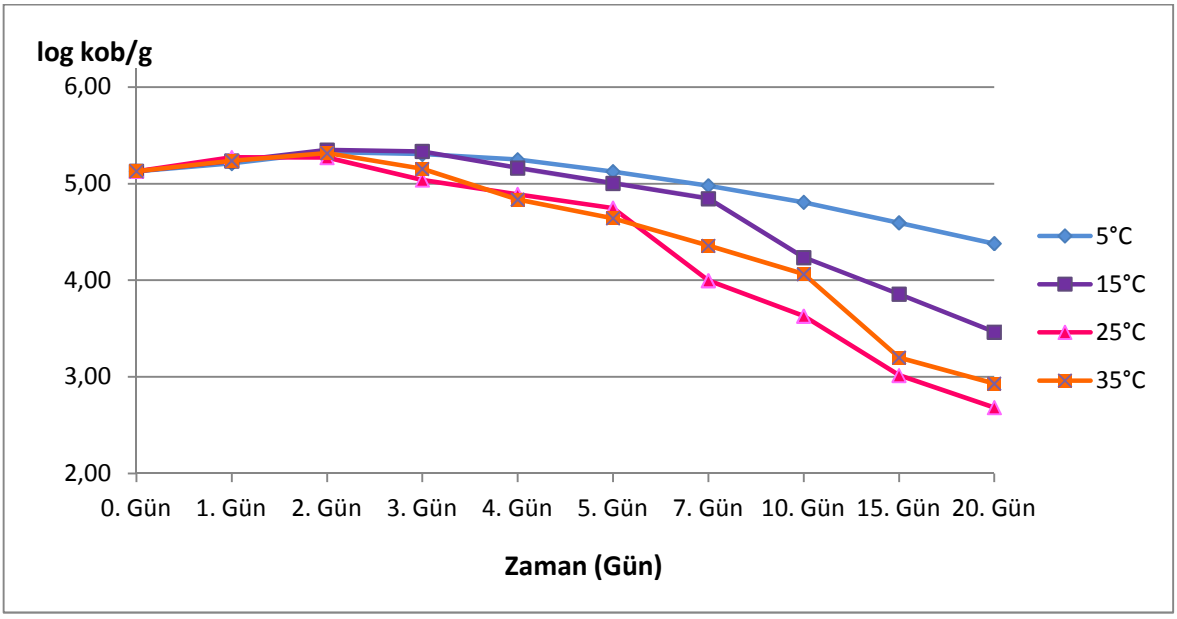
Tablo 3.3. Su Aktivitesi, Sıcaklık ve Zamanın Küf Gelişimi Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	9	15.3705	89.47	0.000
X_1 (Su Aktivitesi)	1	90.3565	525.93	0.000
X_2 (Sıcaklık)	1	9.4252	54.86	0.000
X_3 (Zaman)	1	12.2065	71.05	0.000
X_1*X_1	1	0.0849	0.49	0.483
X_2*X_2	1	0.4904	2.84	0.092
X_3*X_3	1	0.4439	2.58	0.109
X_1*X_2	1	20.3890	118.68	0.000
X_1*X_3	1	38.9736	226.85	0.000
X_2*X_3	1	6.0428	35.17	0.000
Saf Hata	160	0.0462		
Toplam	319			
R^2	%72.20			
R^2_{adj}	%71.40			
R^2_{pred}	%69.58			

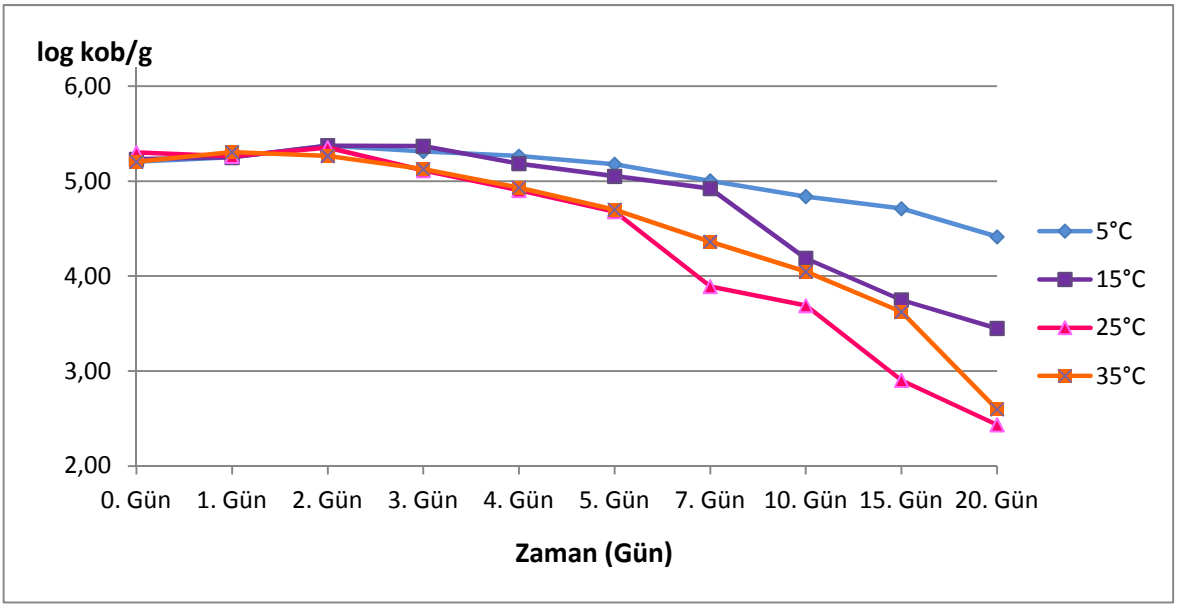
SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

3.1.1. Kontamine Kırmızıbiberlerin Küf Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

Aflatoksijenik *A. flavus* ile kontamine edilen kırmızıbiber numunelerinin 0.80 a_w'de 20 gün depolanması sürecinde AFPA ve DRBC besiyerlerindeki logaritmik küf sayılarının sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişimi sırasıyla Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

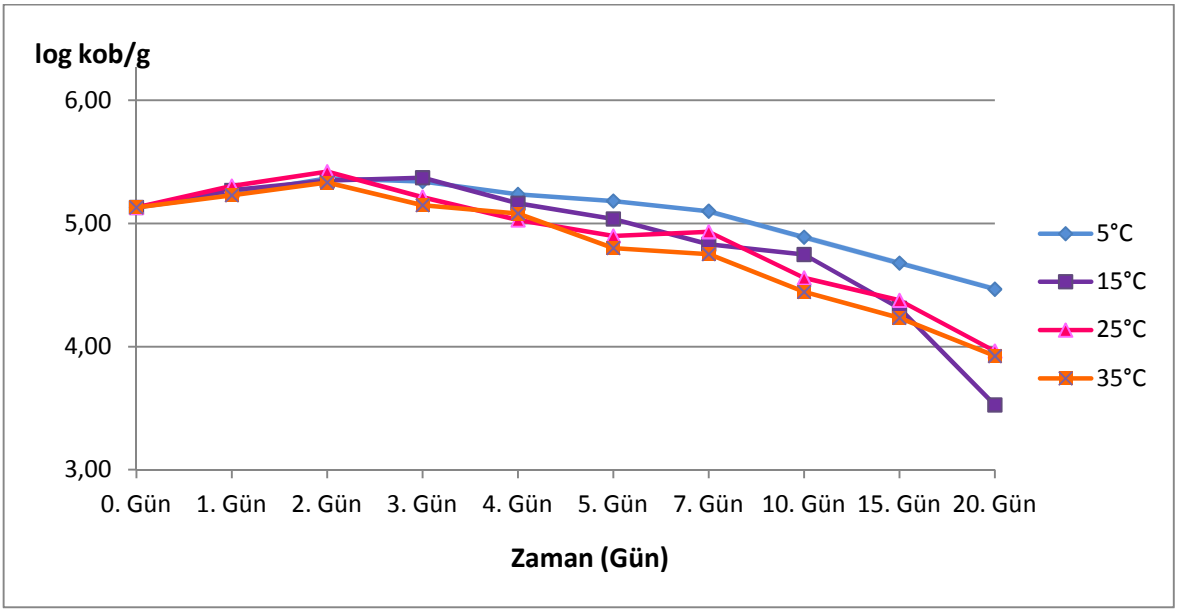


Şekil 3.4. 0.80 a_w'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

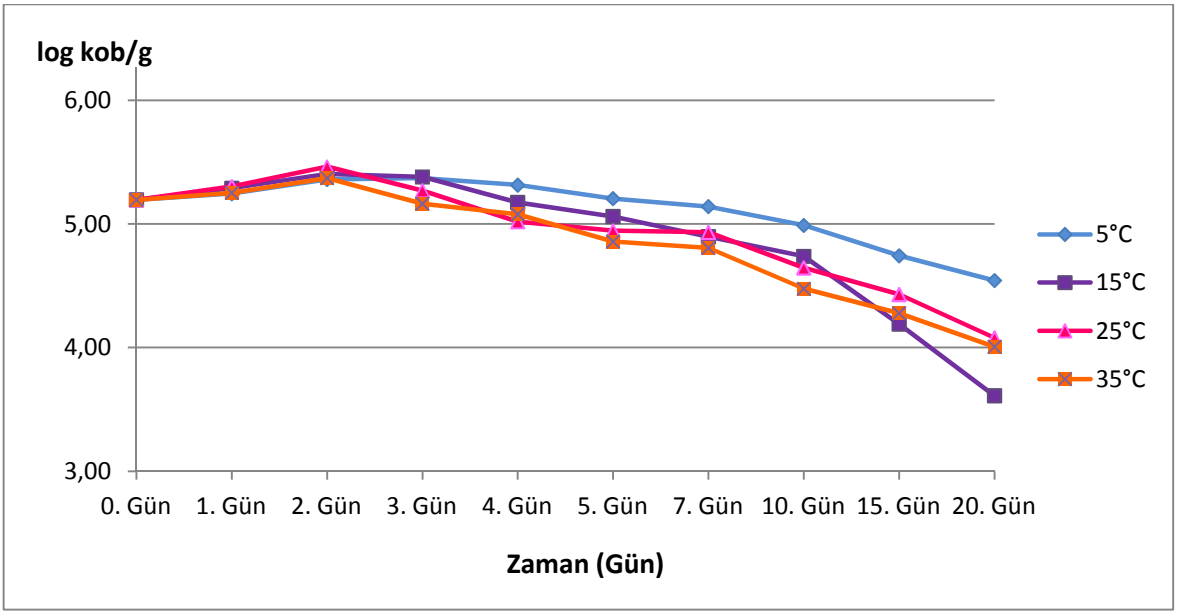


Şekil 3.5. 0.80 a_w'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

Kontamine kırmızıbiber numunelerinin 0.85 a_w'de 20 gün depolanması sürecinde AFPA ve DRBC besiyerlerindeki logaritmik küf sayılarının sıcaklıkla zamana bağlı olarak değişimi sırasıyla Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de verilmiştir.

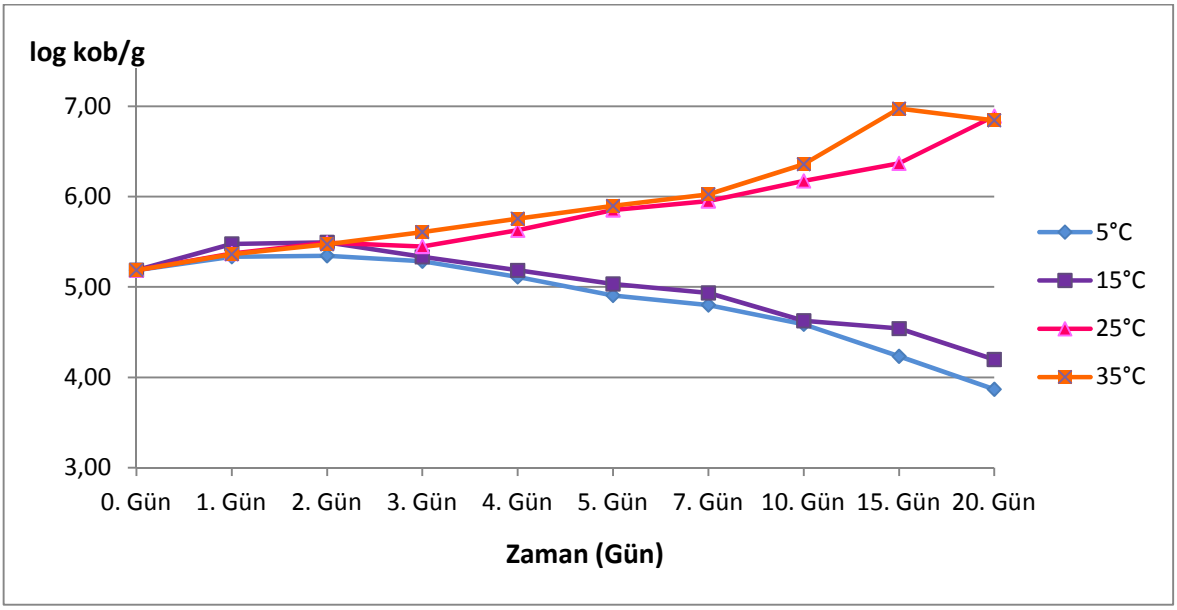


Şekil 3.6. 0.85 a_w'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

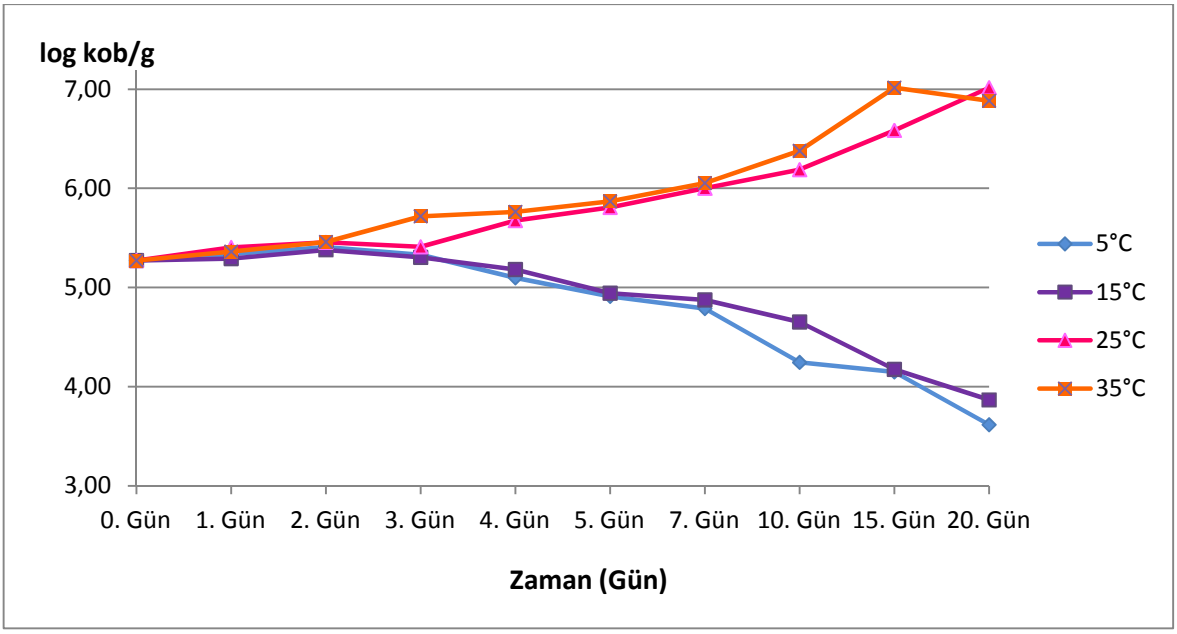


Şekil 3.7. 0.85 a_w'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

A. flavus spor süspansiyonu ile kontamine edilen kırmızıbiber numunelerinin 0.90 a_w'de depolanması sürecinde AFPA ve DRBC besiyerlerindeki logaritmik küf sayılarının sıcaklıkla 20 gün boyunca değişimi sırasıyla Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da verilmiştir.

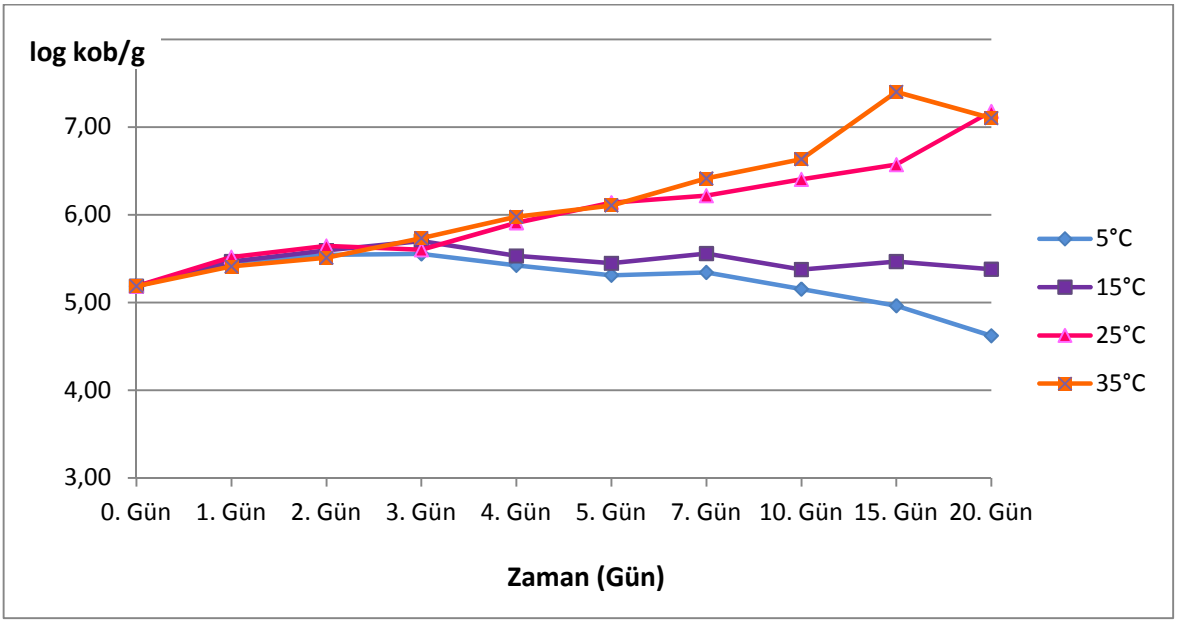


Şekil 3.8. 0.90 a_w'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

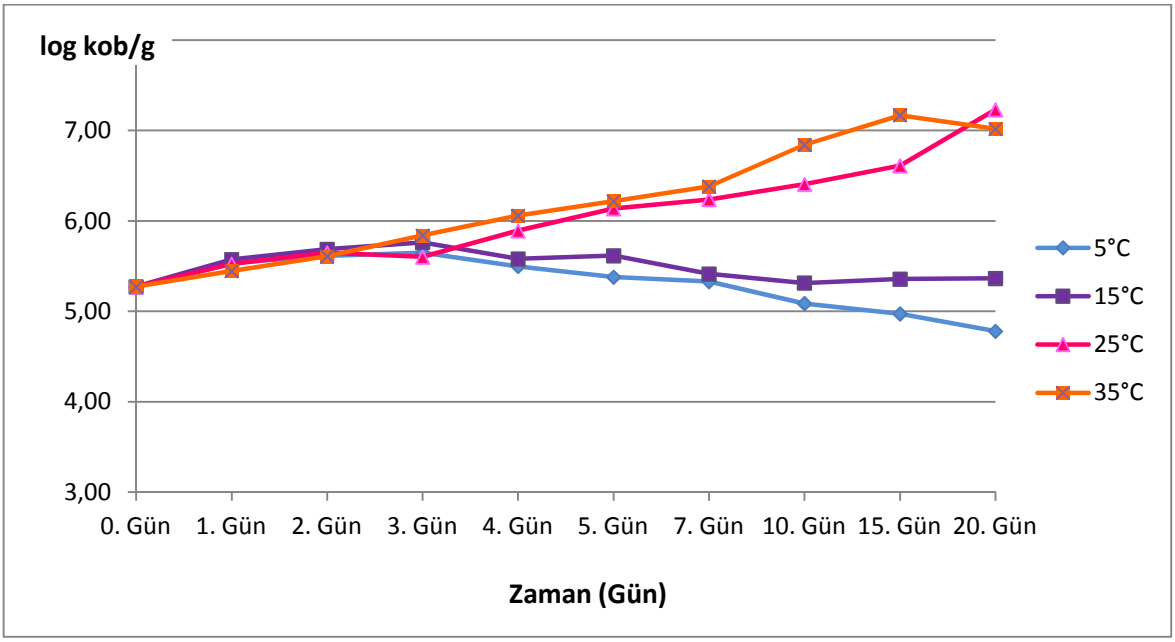


Şekil 3.9. 0.90 a_w'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

A. flavus ile kontamine edilen kırmızıbiber numunelerinin 0.95 a_w'de depolanması sürecinde AFPA ve DRBC besiyerlerindeki logaritmik küf sayılarının sıcaklıkla 20 gün boyunca değişimi sırasıyla Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de verilmiştir.



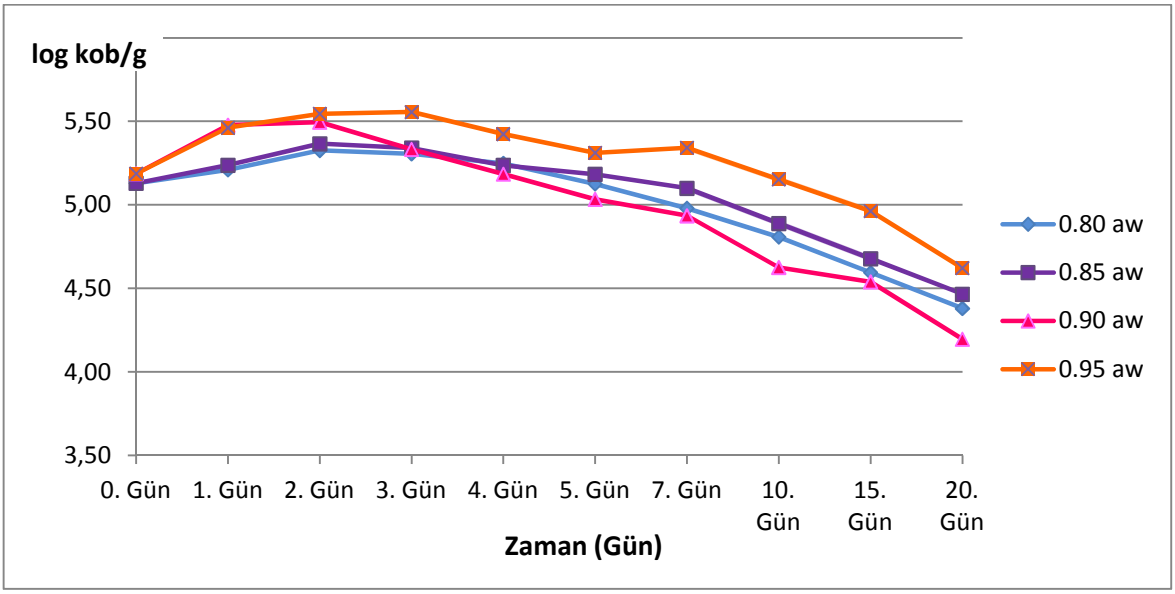
Şekil 3.10. 0.95 a_w'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi



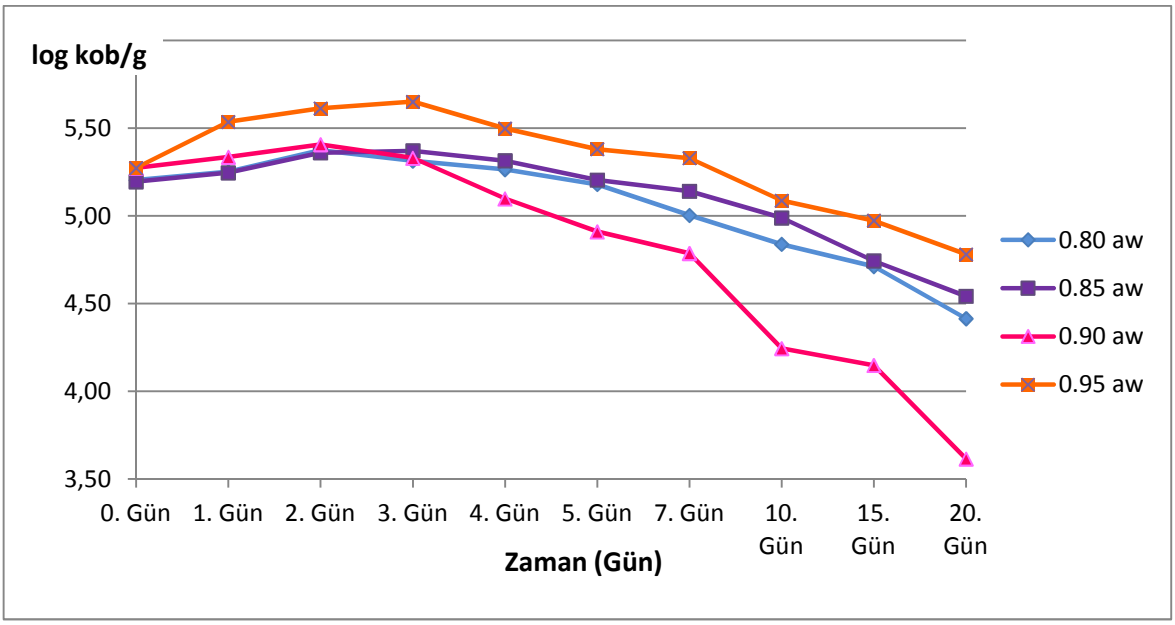
Şekil 3.11. 0.95 a_w'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

3.1.2. Kontamine Kırmızıbiberlerin Küf Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95 a_w değerlerine ayarlanan kontamine kırmızıbiber numunelerinin 5°C'de 20 gün depolanması sürecinde AFPA ve DRBC besiyerlerindeki logaritmik küf sayılarına, zamanla a_w'nin etkisi sırasıyla Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'te gösterilmiştir.

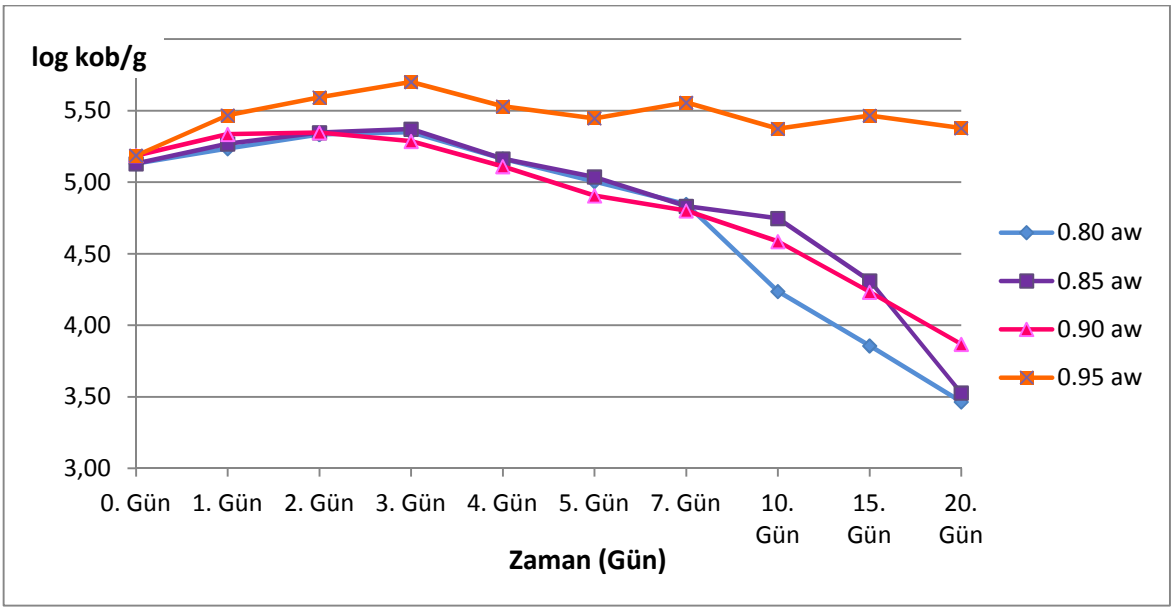


Şekil 3.12. 5°C'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

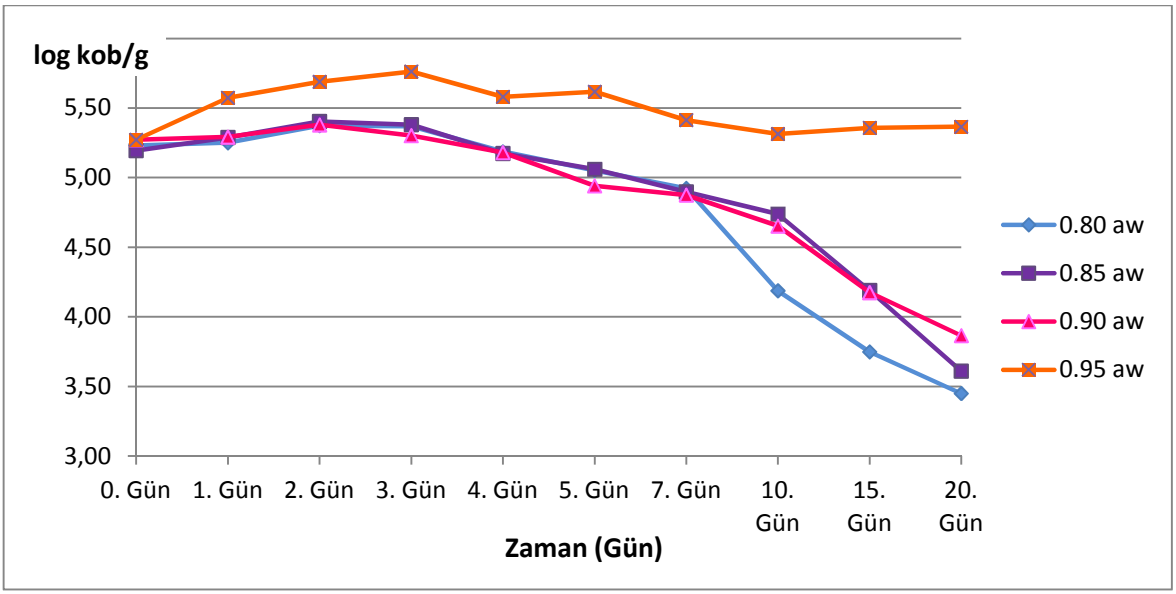


Şekil 3.13. 5°C'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

Farklı a_w değerlerine ayarlandıktan sonra aflatoksijenik *A. flavus* ile kontamine edilen kırmızıbiber numunelerinin 15°C'de 20 gün depolanması sürecinde AFPA ve DRBC besiyerlerindeki logaritmik küf sayılarına, zamana bağlı olarak a_w'nin etkisi sırasıyla Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'te gösterilmiştir.

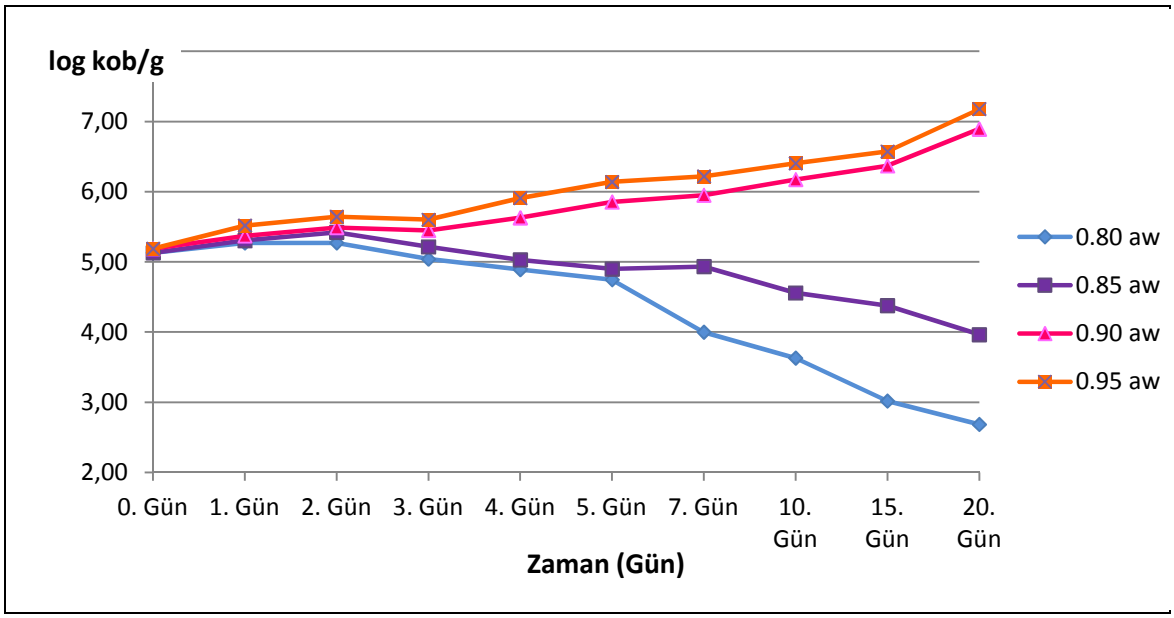


Şekil 3.14. 15°C'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

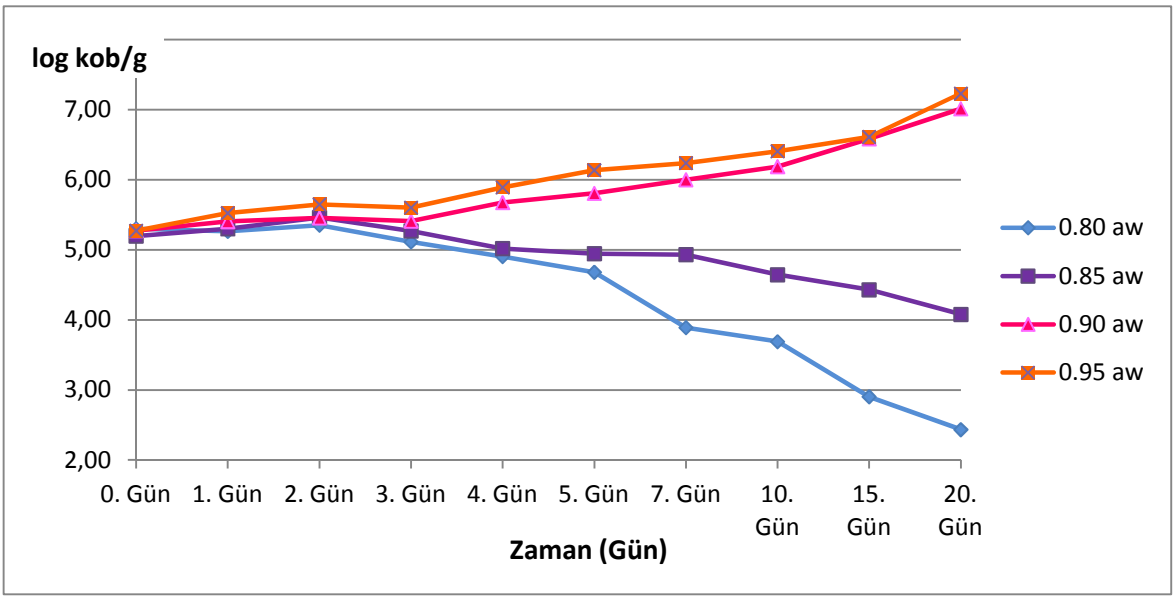


Şekil 3.15. 15°C'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

Aflatoksijenik *A. flavus* ile kontamine edilen kırmızıbiber numunelerinin 4 a_w seviyesinde 25°C'de 20 gün depolanması sürecinde AFPA ve DRBC besiyerlerindeki logaritmik küf sayılarına a_w ve zamanın etkisi sırasıyla Şekil 3.16 ve Şekil 3.17'de verilmiştir.

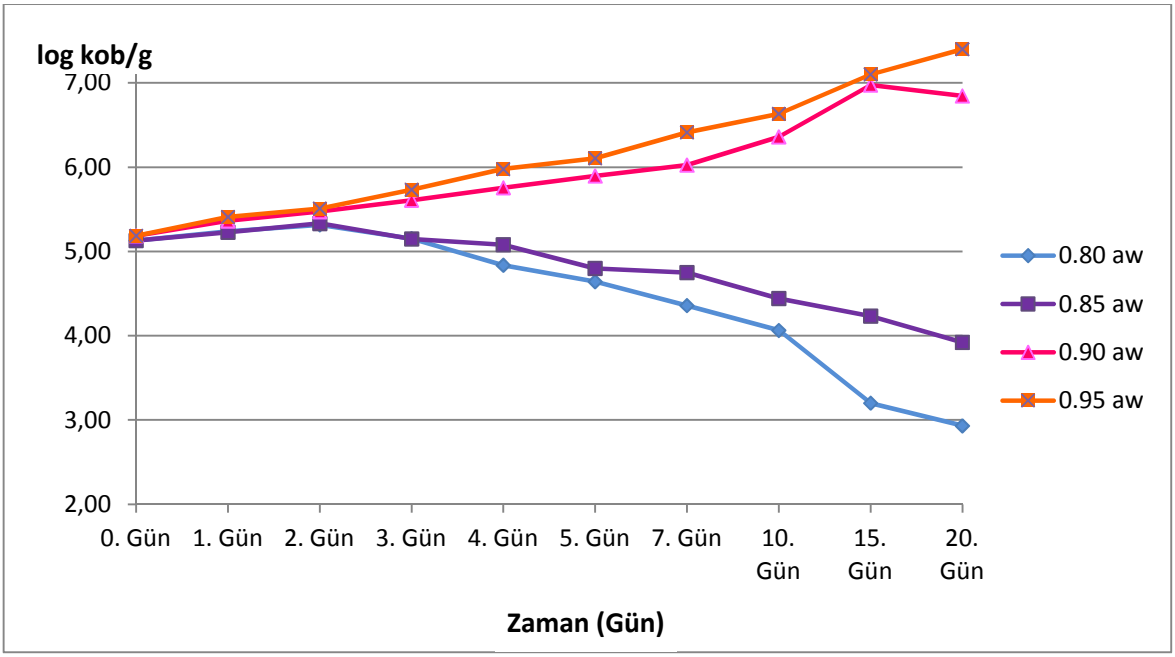


Şekil 3.16. 25°C'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

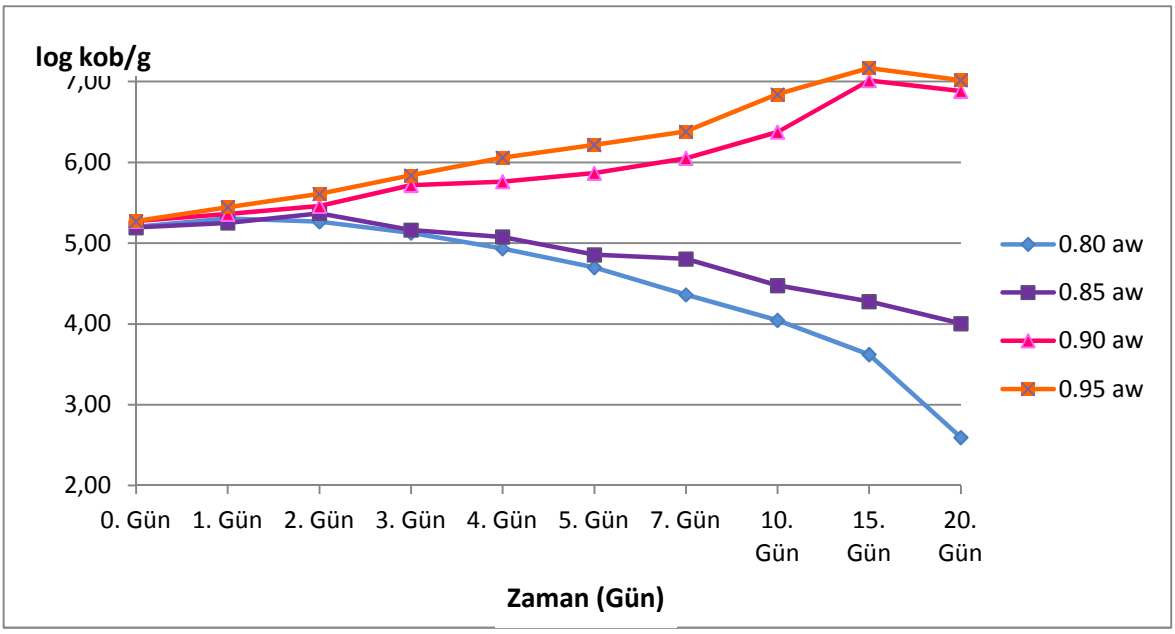


Şekil 3.17. 25°C'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

Farklı a_w seviyelerindeki kontamine kırmızıbiber numunelerinin 35°C'de 20 gün depolanması sürecinde AFPA ve DRBC besiyerlerindeki logaritmik küf sayılarına a_w ve zamanın etkisi sırasıyla Şekil 3.18 ve Şekil 3.19'da verilmiştir.



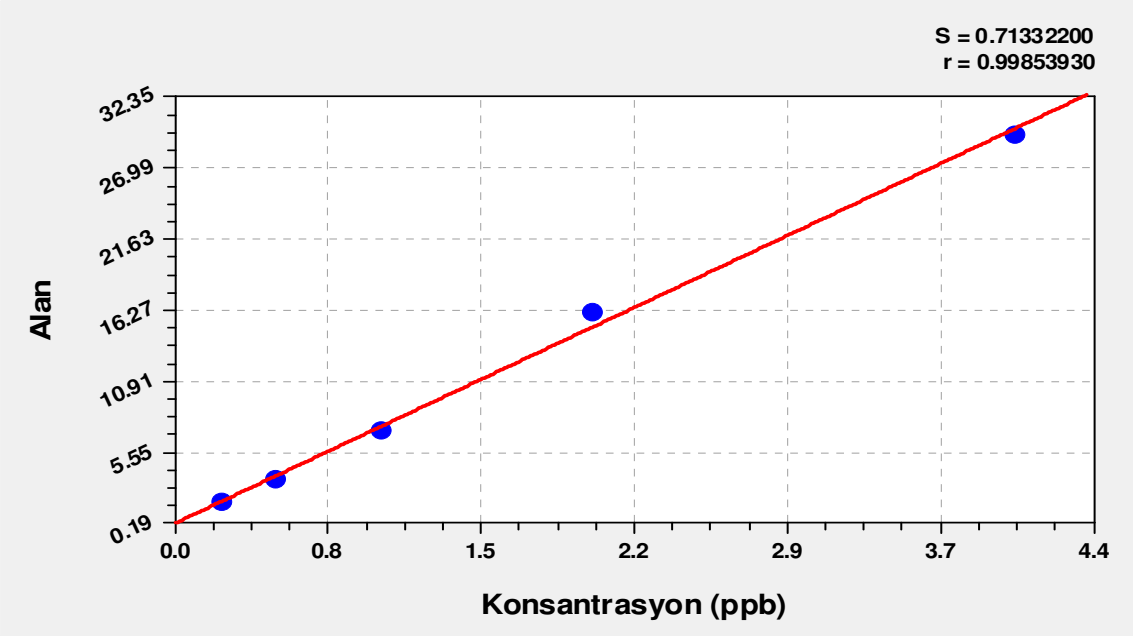
Şekil 3.18. 35°C'de AFPA Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi



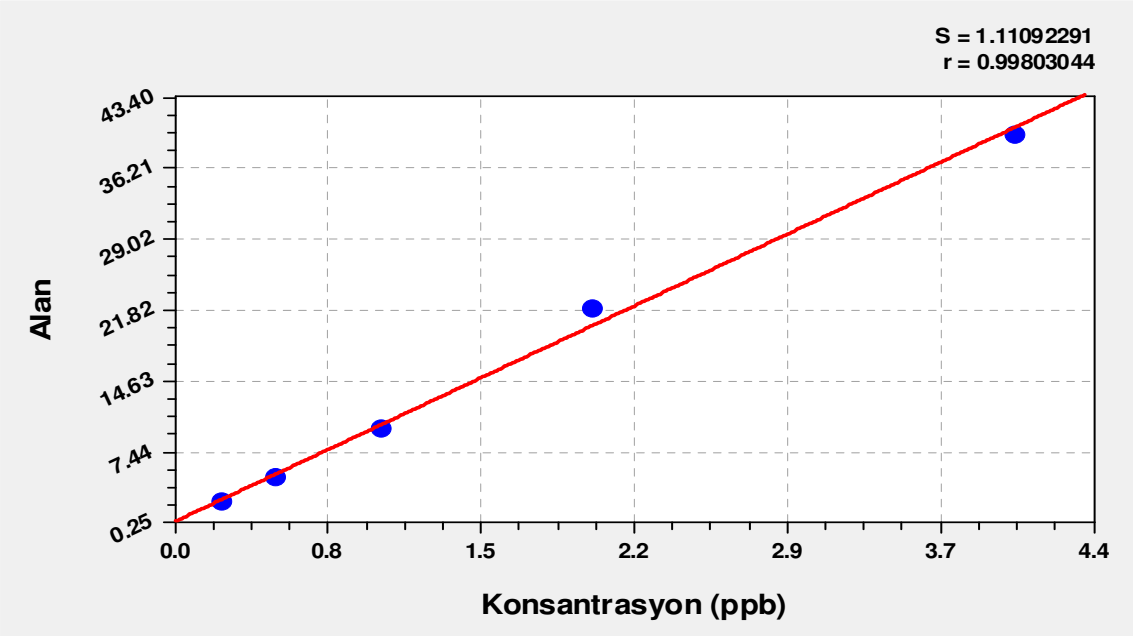
Şekil 3.19. 35°C'de DRBC Besiyerindeki Logaritmik *A. flavus* Koloni Sayısının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

3.2. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki Aflatoksin Miktarları

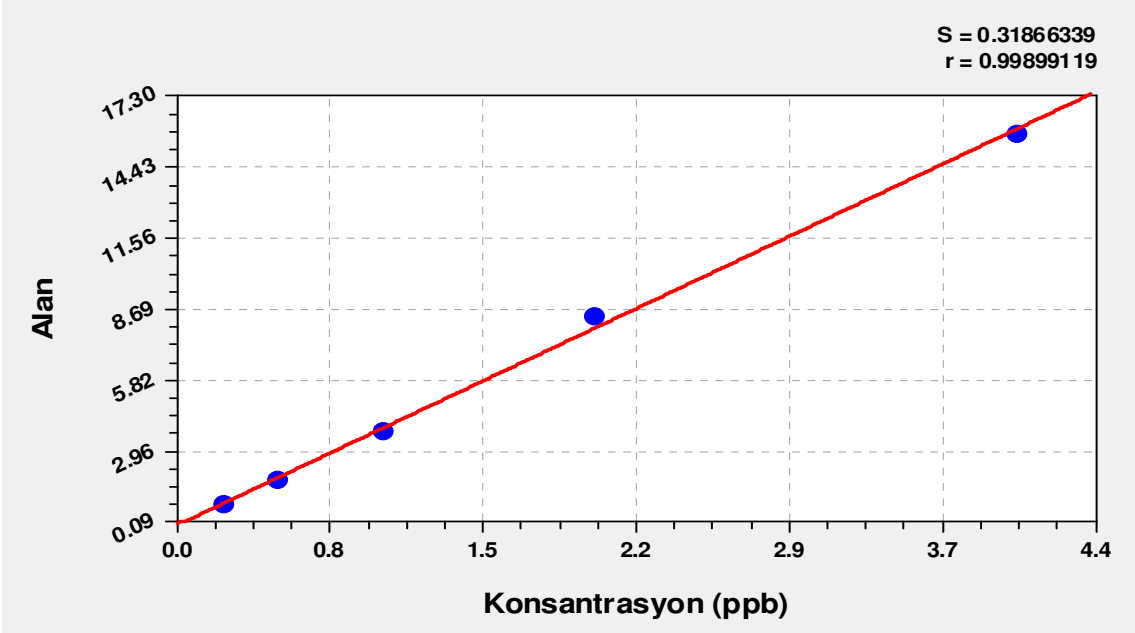
Aflatoksin analizleri öncesinde, AFB_1, AFB_2, AFG_1 ve AFG_2 standart çözeltileri kullanılarak HPLC'de kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Şekil 3.20, Şekil 3.21, Şekil 3.22 ve Şekil 3.23'te bu lineer grafikler ve her birine ait standart sapma ve regresyon katsayıları görülmektedir. Toplam aflatoksin analizi için yapılan validasyon çalışmasında, cihazın tespit limiti (LOD) 0.125 ppb, ölçüm limiti (LOQ) ise 0.420 ppb olarak belirlenmiştir.



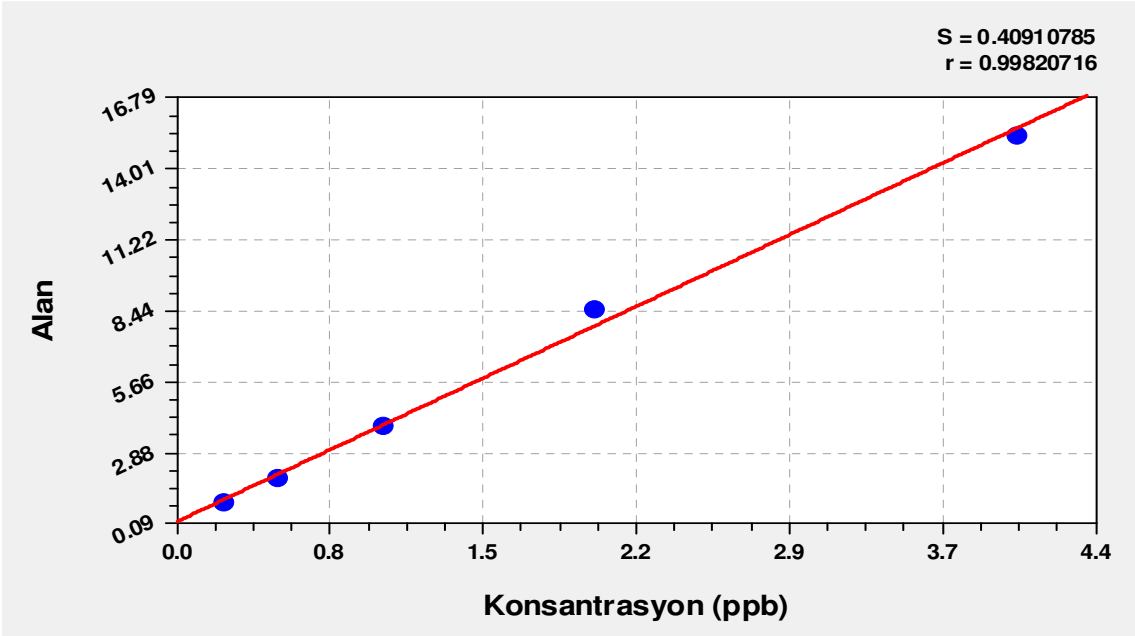
Şekil 3.20. AFB_1 Kalibrasyon Grafiği



Şekil 3.21. AFB_2 Kalibrasyon Grafiği



Şekil 3.22. AFG_1 Kalibrasyon Grafiği



Şekil 3.23. AFG_2 Kalibrasyon Grafiği

Çalışmada materyal olarak kullanılan kırmızıbiber numunelerinde, kontaminasyondan önce aflatoksin analizi yapılmış ve tespit edilebilir düzeyde aflatoksin bulunmadığı teyit edilmiştir.

Kontamine kırmızıbiber numunelerinde yapılan aflatoksin analizinde AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2 toksin fraksiyonları ayrı ayrı tespit edilmiş ancak, kırmızıbiber kontaminasyonunda kullanılan *A. flavus* suşunun sadece AFB_1 ile AFB_2 üretmesi ve toplam aflatoksin içinde en büyük fraksiyonu AFB_1'in oluşturması sebebiyle, aflatoksin

için sadece AFB_1 değeri çalışma verisi olarak kullanılmıştır. 0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95 a_w değerlerine ayarlanan ve 4 farklı sıcaklıkta 20 gün boyunca muhafaza edilen kontamine kırmızıbiberlerde tespit edilen AFB_1 değerleri ppb olarak, Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde AFB_1 Miktarları (ppb)*

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	Sıcaklık			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	7.60±0.26	7.60±0.26	7.60±0.26	7.60±0.26
	1	8.13±0.44	7.65±0.35	7.83±0.16	8.15±0.04
	2	8.72±0.64	7.78±0.36	8.91±0.24	8.77±0.30
	3	8.57±0.30	8.78±0.08	9.28±0.49	9.16±0.51
	4	8.81±0.42	9.02±0.26	9.75±0.09	9.43±1.11
	5	9.14±0.46	9.75±0.69	9.70±0.83	10.58±0.79
	7	8.92±1.06	8.93±0.81	10.50±0.73	11.21±0.64
	10	7.84±0.27	8.90±0.89	9.19±1.05	9.54±0.49
	15	7.32±0.21	8.25±0.08	9.11±0.84	9.88±0.01
	20	6.43±0.11	7.49±0.06	9.22±1.16	8.86±0.62
	Ortalama	8.15±0.95^{Cc}	8.41±0.87^{Cbc}	9.06±1.03^{Bab}	9.32±1.17^{Ca}
0.85	0	7.60±0.26	7.60±0.26	7.60±0.26	7.60±0.26
	1	8.09±0.06	8.11±0.15	7.95±0.34	7.88±0.19
	2	8.73±0.19	8.65±0.04	10.89±1.64	9.97±0.34
	3	8.95±0.66	9.32±0.35	12.14±0.88	11.53±0.96
	4	9.23±0.20	10.66±0.96	11.93±1.05	13.63±0.50
	5	10.19±0.34	10.33±0.22	12.04±0.48	15.01±0.05
	7	9.60±0.44	9.72±0.56	12.74±0.77	15.39±0.00
	10	8.40±1.15	10.02±0.74	11.52±1.69	13.43±0.83
	15	7.78±0.47	9.90±0.26	11.13±1.13	12.25±0.99
	20	7.22±0.44	9.43±0.29	10.38±1.13	10.96±1.19
	Ortalama	8.15±1.03^{Cb}	9.37±1.04^{Cb}	10.83±1.96^{Ba}	11.76±2.67^{BCa}
0.90	0	7.92±0.42	7.92±0.42	7.92±0.42	7.92±0.42
	1	8.29±0.16	8.98±0.47	8.48±0.22	8.64±0.07
	2	9.27±0.31	10.15±0.21	10.13±0.04	10.68±0.49
	3	11.02±0.77	11.37±0.86	13.25±0.12	13.90±0.62
	4	10.79±1.66	11.38±0.12	14.49±0.18	17.55±2.33
	5	12.22±0.46	14.85±0.29	17.67±0.20	20.27±1.91
	7	11.79±1.33	13.73±0.15	20.52±0.05	21.82±1.23
	10	11.16±2.53	12.45±0.22	18.94±0.37	25.87±0.22
	15	10.27±0.88	12.41±0.15	20.25±0.71	28.84±0.80
	20	9.27±0.13	12.83±0.96	21.27±0.04	26.50±0.62
	Ortalama	10.20±1.79^{Bb}	11.60±2.07^{Bb}	15.29±4.90^{Ba}	18.20±7.37^{Ba}
0.95	0	7.92±0.42	7.92±0.42	7.92±0.42	7.92±0.42
	1	8.46±0.35	8.90±0.12	8.78±0.09	8.43±0.08
	2	9.78±0.45	13.60±0.46	10.04±0.32	10.46±0.33
	3	10.67±1.01	15.48±4.90	19.15±3.46	19.81±2.42
	4	11.30±0.71	17.70±1.49	24.52±1.06	25.47±2.07
	5	13.31±0.56	19.67±0.38	27.32±0.27	38.60±1.33
	7	15.24±0.67	20.39±2.67	40.30±1.88	52.70±2.93
	10	13.39±0.93	20.32±2.69	43.65±1.91	56.90±3.35
	15	13.65±0.52	20.95±4.27	57.21±3.01	61.56±0.97
	20	11.52±0.94	19.50±3.25	54.69±2.29	58.05±0.41
	Ortalama	11.52±2.37^{Ab}	16.44±5.30^{Ab}	29.35±17.79^{Aa}	33.99±21.04^{Aa}

*: Ortalama±standart sapma; A-C: Farklı harfler, aynı sütun için, o sütüna ait sıcaklık seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).; a-c: Farklı harfler, aynı satır için, o satıra ait su aktivitesi seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın AFB_1 üretimi üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.5'te verilmiştir. Tablo 3.5'te verilen tahminleyiciler AFB_1'deki değişkenliğin yaklaşık %78'ini açıklayabilmektedir. Bu tabloda görüldüğü gibi, AFB_1 oluşumu üzerine su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın tek tek etkileri, oldukça önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. AFB_1 üretimine sıcaklık faktörünün kuadratik etkisinin istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) olduğu, su aktivitesi ve zaman faktörünün kuadratik etkilerinin ise istatistiksel olarak çok önemli ($p<0.01$) olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, su aktivitesi-sıcaklık, su aktivitesi-zaman ve sıcaklık-zaman faktörlerinin interaksiyonlarının AFB_1 üretimi üzerine etkileri de oldukça önemli ($p<0.01$) bulunmuştur.

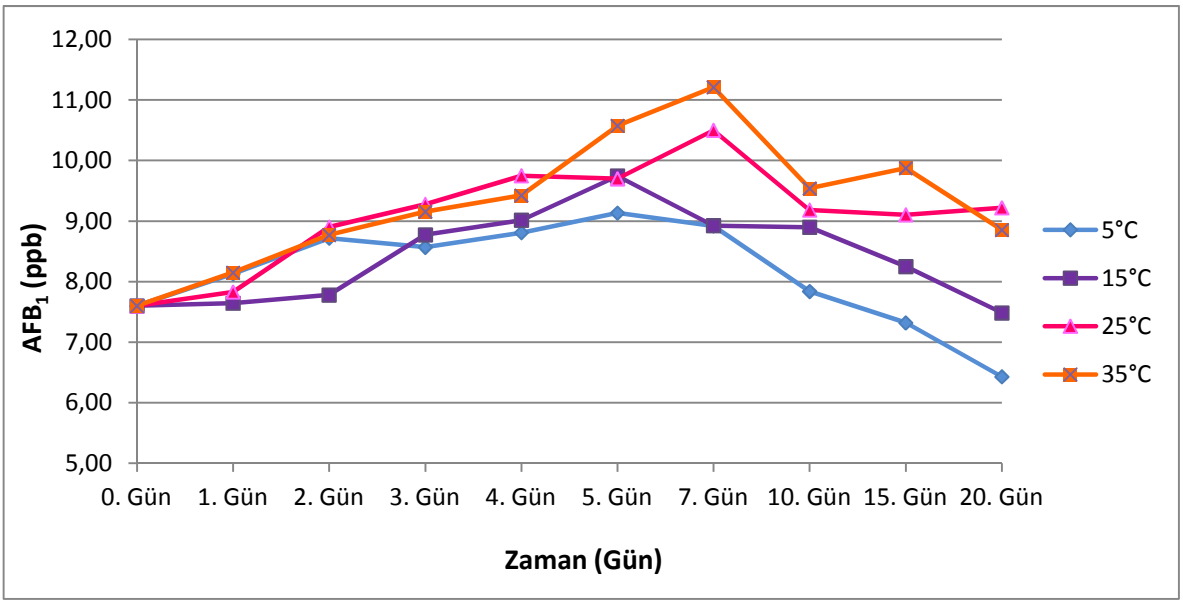
Tablo 3.5. Su Aktivitesi, Sıcaklık ve Zamanın AFB_1 Üretimi Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	9	3071.9	125.98	0.000
X_1 (Su Aktivitesi)	1	12443.9	510.35	0.000
X_2 (Sıcaklık)	1	5797.1	237.75	0.000
X_3 (Zaman)	1	2960.9	121.43	0.000
X_1*X_1	1	1156.1	47.42	0.000
X_2*X_2	1	2.3	0.09	0.761
X_3*X_3	1	1485.7	60.93	0.000
X_1*X_2	1	3004.5	123.22	0.000
X_1*X_3	1	4178.4	171.36	0.000
X_2*X_3	1	2143.0	76.48	0.000
Saf Hata	160	2.5		
Toplam	319			
R^2	%78.53			
R^2_{adj}	%77.91			
R^2_{pred}	%76.46			

SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

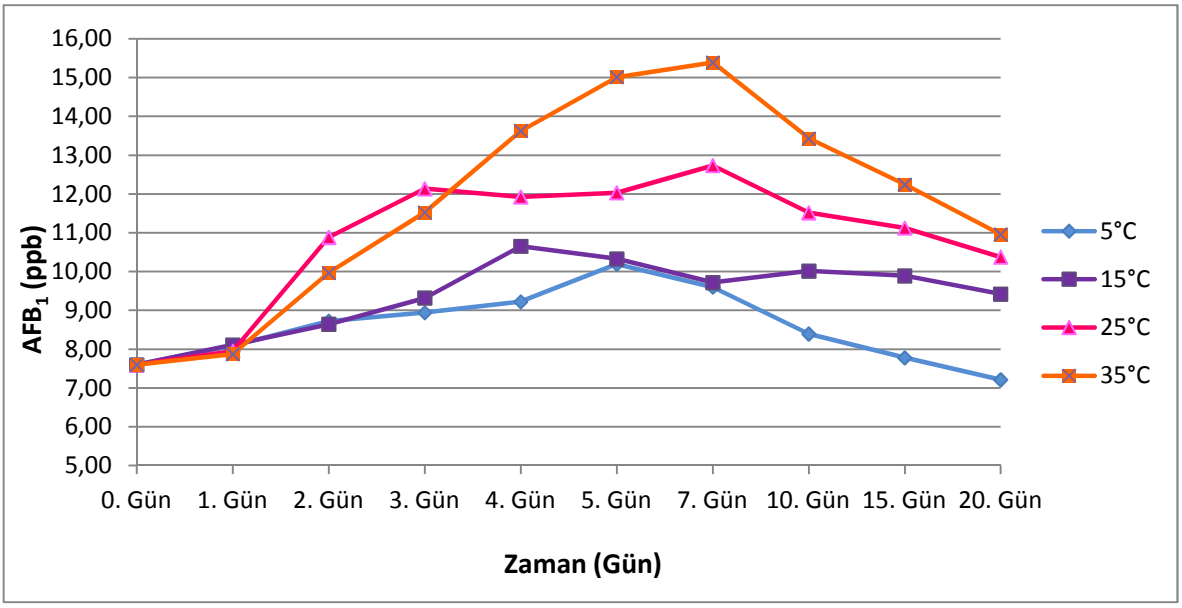
3.2.1. Kontamine Kırmızıbiberlerin AFB_1 Miktarlarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

0.80 a_w'de 20 gün depolanan kontamine kırmızıbiberlerin AFB_1 düzeylerinin sıcaklıkla zamana bağlı olarak değişimi, Şekil 3.24'te grafikle gösterilmiştir.



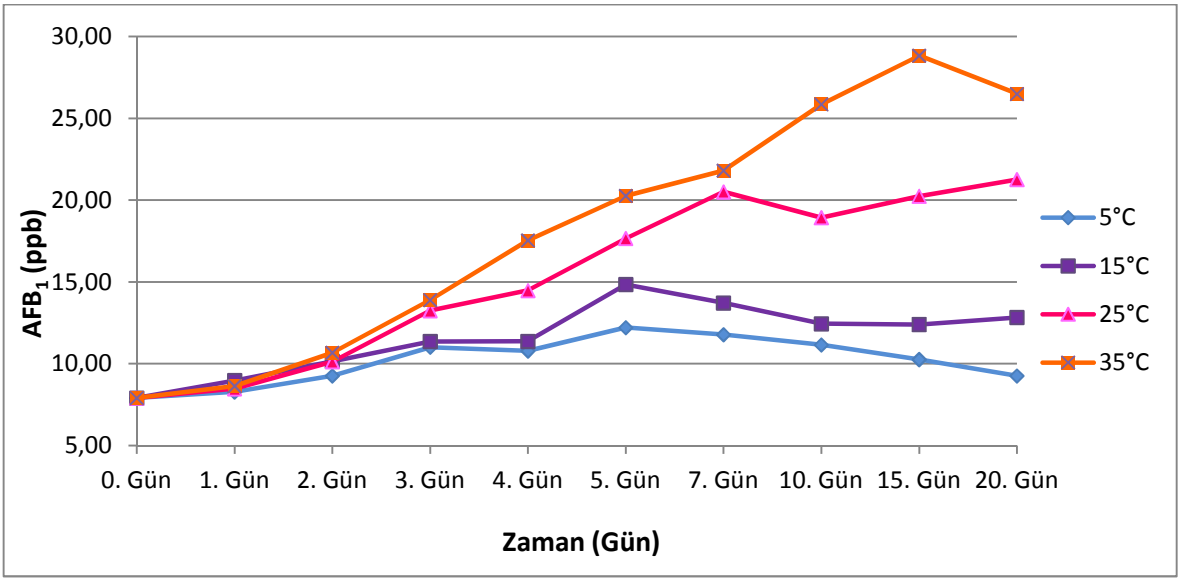
Şekil 3.24. 0.80 a_w'de AFB_1'in Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

0.85 a_w'de 20 gün depolanan kontamine kırmızıbiberlerin AFB_1 düzeylerinin sıcaklıkla zamana bağlı olarak değişimi, Şekil 3.25'te grafikle gösterilmiştir.



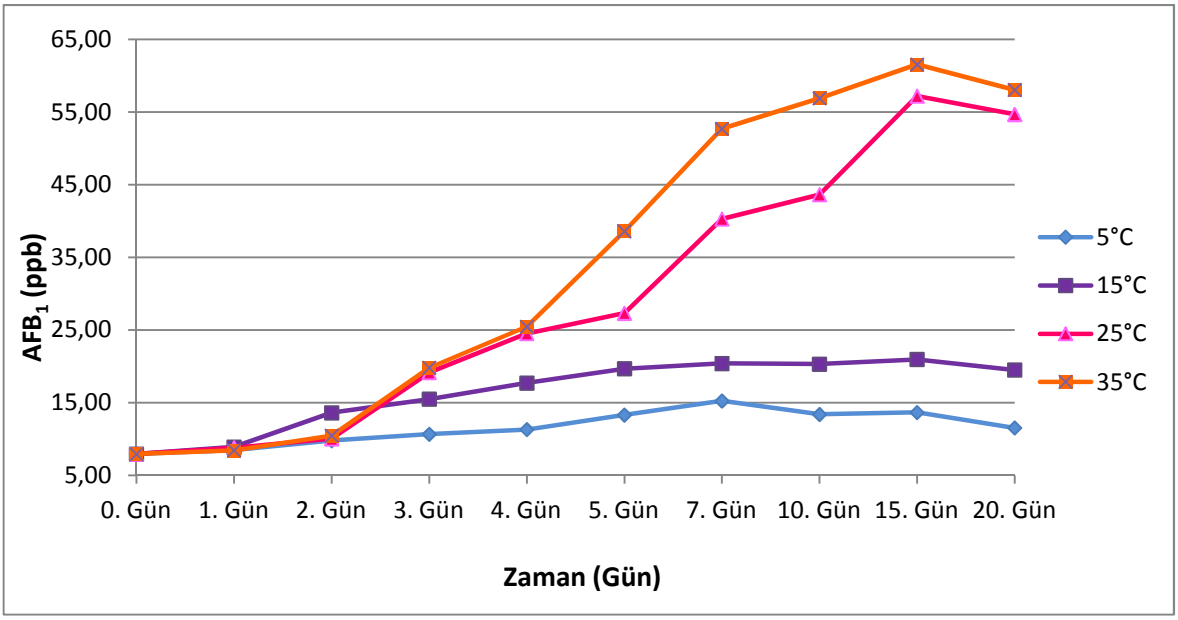
Şekil 3.25. 0.85 a_w'de AFB_1'in Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

0.90 a_w'de 20 gün depolanan kontamine kırmızıbiberlerin AFB_1 düzeylerinin sıcaklıkla zamana bağlı olarak değişimi, Şekil 3.26'da grafikle gösterilmiştir.



Şekil 3.26. 0.90 a_w'de AFB_1'in Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

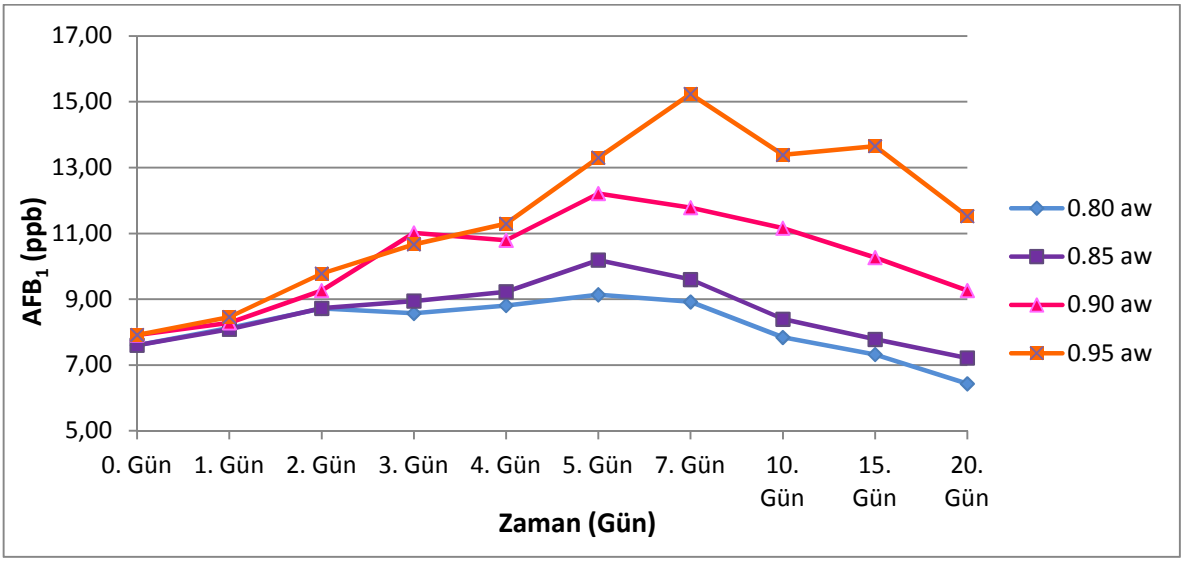
0.95 a_w'de 20 gün depolanan kontamine kırmızıbiberlerin AFB_1 düzeylerinin sıcaklıkla zamana bağlı olarak değişimi, Şekil 3.27'de grafikle gösterilmiştir.



Şekil 3.27. 0.95 a_w'de AFB_1'in Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

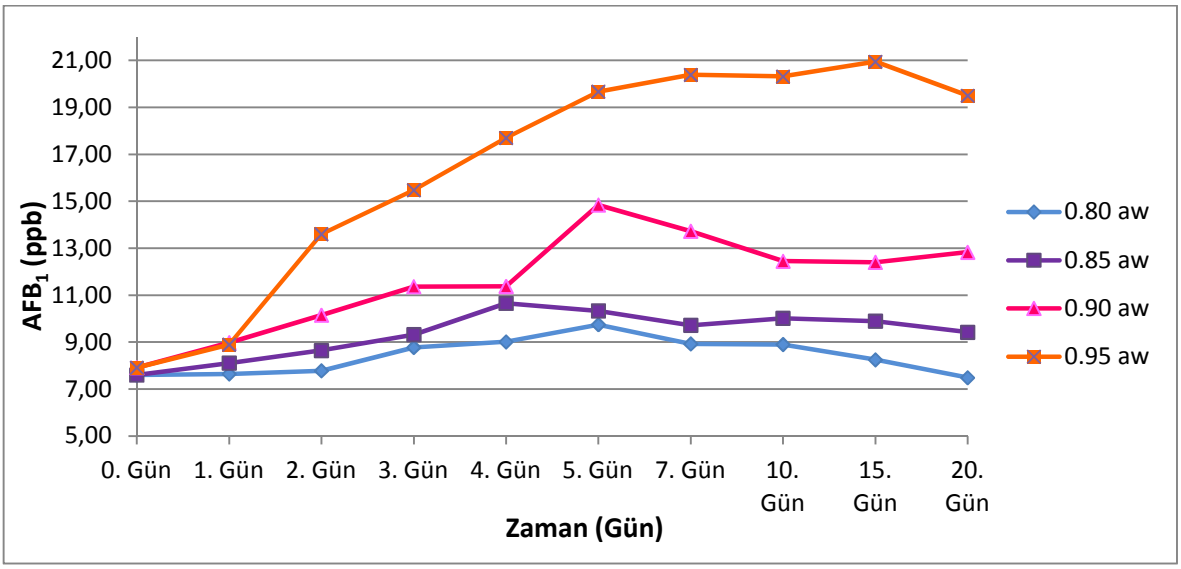
3.2.2. Kontamine Kırmızıbiberlerin AFB_1 Miktarlarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

Aflatoksijenik *A. flavus* ile kontamine edilen kırmızıbiber numunelerinin 5°C'de 20 gün depolanması sürecinde AFB_1 miktarının a_w ve zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.28'de gösterilmiştir.



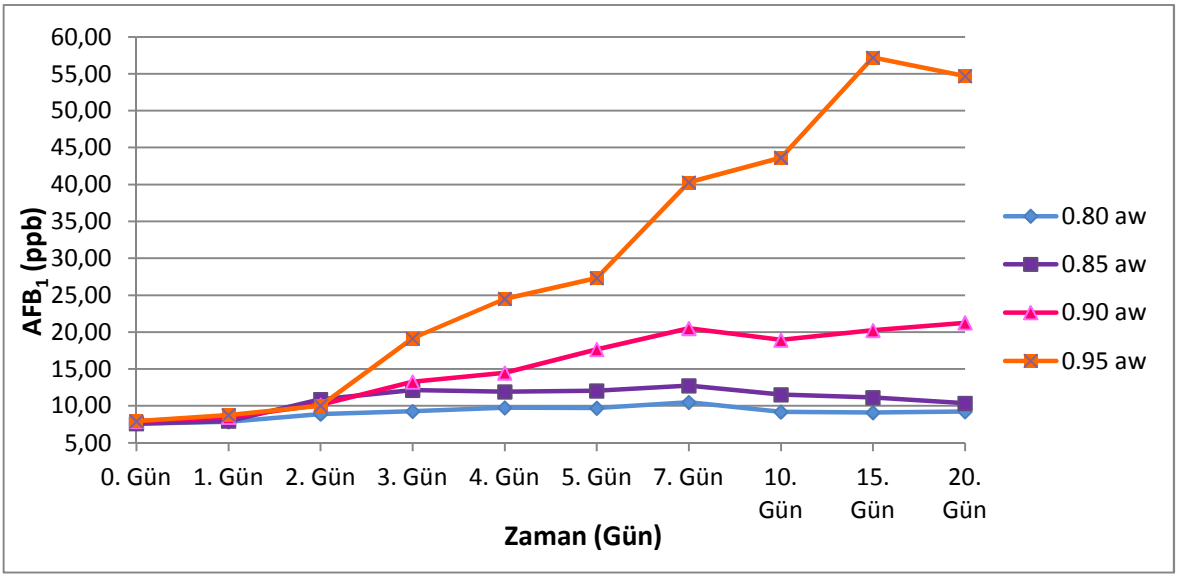
Şekil 3.28. 5°C'de AFB_1'in Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

Kontamine kırmızıbiber numunelerinin 15°C'de 20 gün depolanması sürecinde AFB_1 miktarının a_w ve zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.29'da verilmiştir.



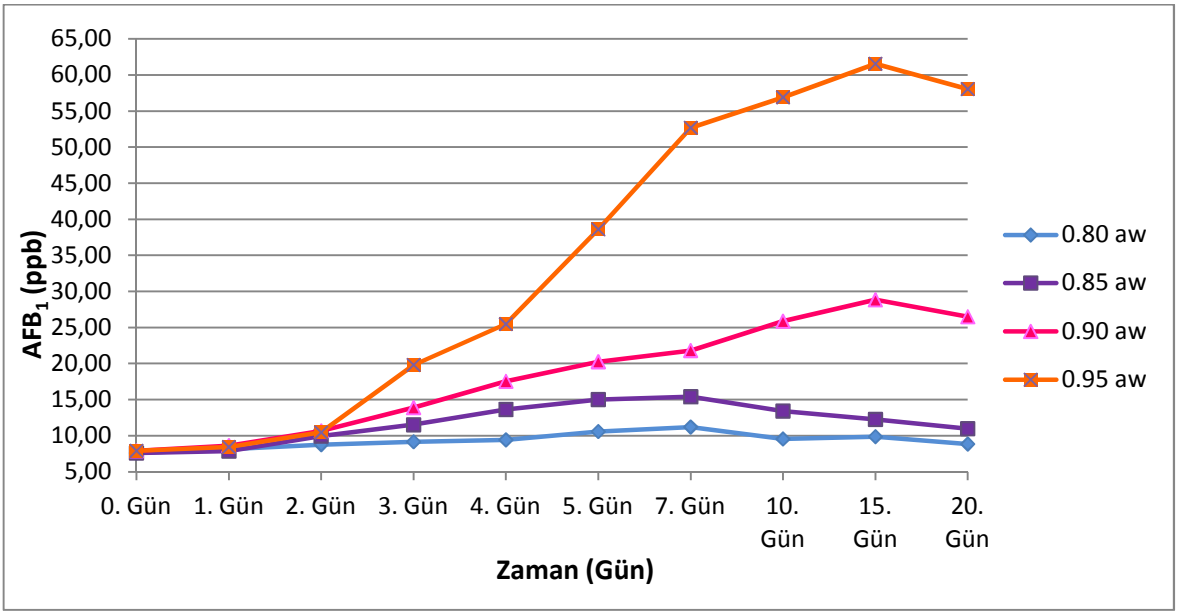
Şekil 3.29. 15°C'de AFB_1'in Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

25°C'de 20 gün depolanan kontamine kırmızıbiber numunelerinin AFB_1 miktarının a_w ve zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.30'da verilmiştir.



Şekil 3.30. 25°C'de AFB_1'in Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

25°C'de 20 gün depolanan kontamine kırmızıbiber numunelerinin AFB_1 miktarının a_w ve zamana bağlı olarak değişimi Şekil 3.31'de verilmiştir.



Şekil 3.31. 35°C'de AFB_1'in Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

3.3. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki *AflR, Nor-1* ve *PksA* Gen Ekspresyon Düzeyleri

Aflatoksijenik *A. flavus* ile kontamine edilen, su aktivitesi 0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95'e ayarlı kırmızıbiber numuneleri 4 farklı sıcaklıkta 20 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve çalışma sürecinde bu örneklerden ekstrakte edilen RNA'ların, ters transkripsiyon GZ-PZR ile *aflR, nor-1* ve *pksA* gen bölgeleri analiz edilmiştir. Analiz edilen gen bölgelerinin RNA numunelerindeki kopya sayılarını tespit etmek için, her bir gen bölgesi *E. coli* DH5-α suşunda klonlanmış ve klonlanmış genleri içeren hücrenin belli konsantrasyonları ile PZR kurulmuştur. Klonlanmış gen içeren hücre konsantrasyonları (gen kopya sayıları) ile hedef gene ait PZR verileri (Cq değerleri) arasındaki ilişki, CurveExpert 1.4 programı ile oluşturulan kuadratik bir grafik ve bu grafiğin kuadratik denklemi ($y=a+bx+cx^2$) kullanılarak tespit edilmiştir. *AflR, nor-1* ve *pksA* gen kopya sayıları için elde edilen grafikler, sırasıyla Şekil 3.32, Şekil 3.33 ve Şekil 3.34'te verilmiştir. Grafiklere ait denklem katsayıları (a, b, c) da aşağıda verilmiştir.

AflR gen kopya sayısı için hazırlanan grafiğe (Şekil 3.32) ait denklem sabitleri:

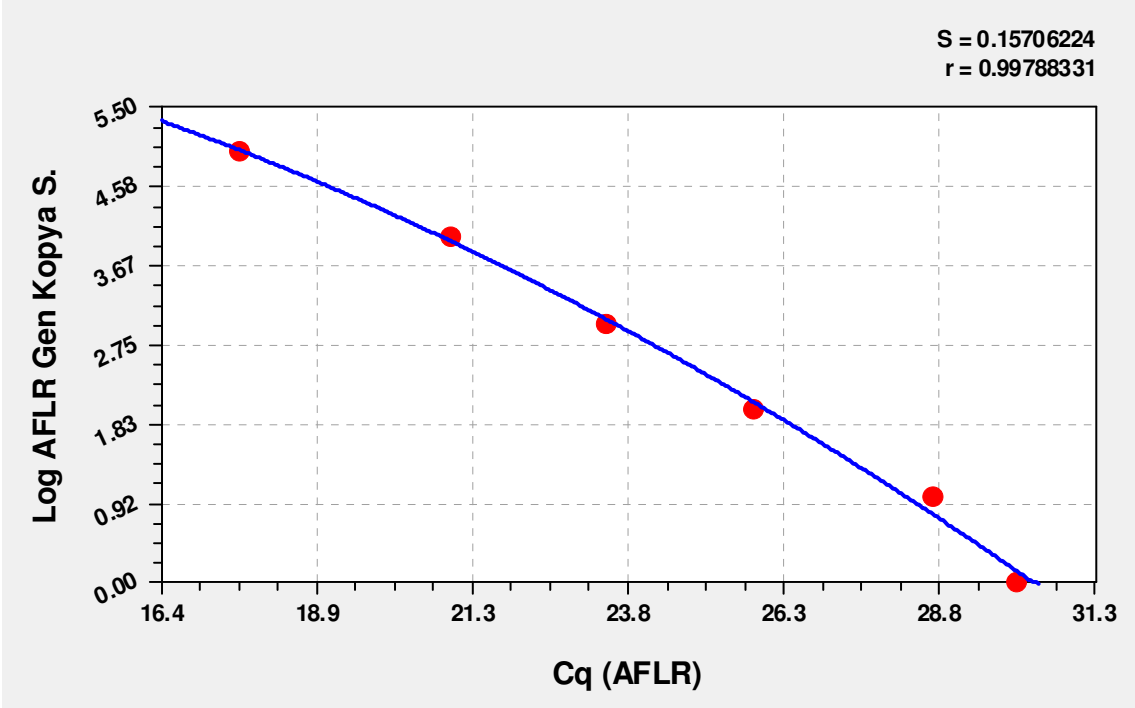
a = 7.22944021001
b = 0.0299565185697
c = - 0.00886742178518

Nor-1 gen kopya sayısı için hazırlanan grafiğe (Şekil 3.34) ait denklem sabitleri:

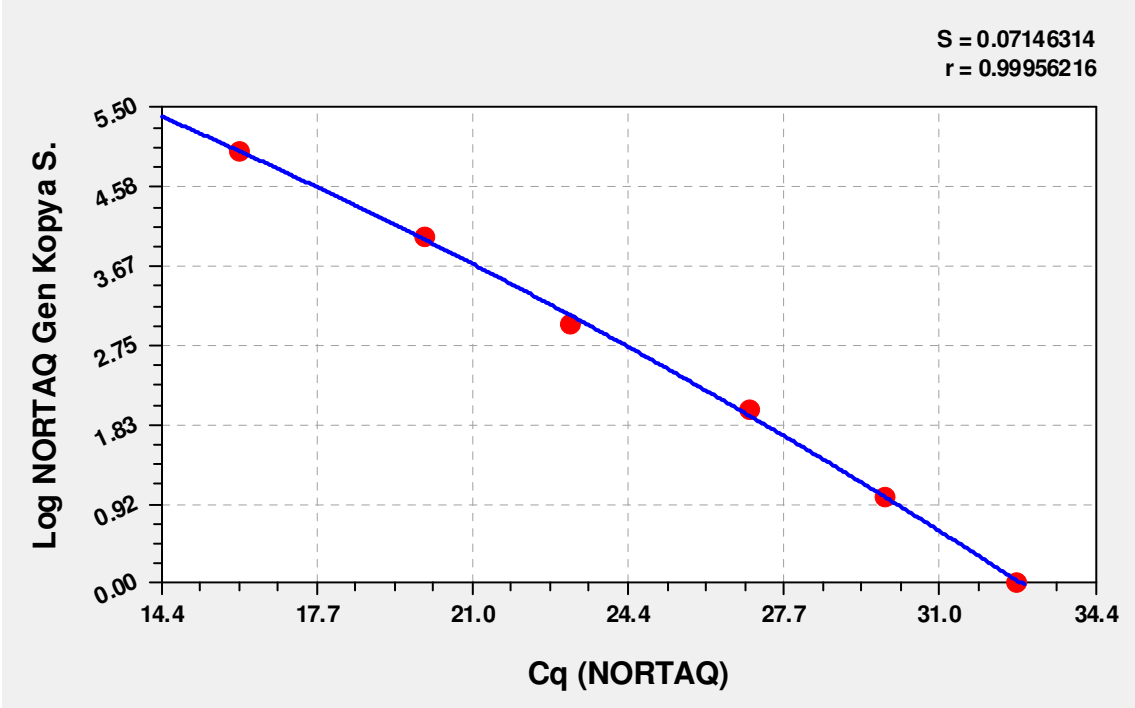
a = 8.11722631437
b = - 0.143886275381
c = - 0.00317360893471

PksA gen kopya sayısı için hazırlanan grafiğe (Şekil 3.33) ait denklem sabitleri:

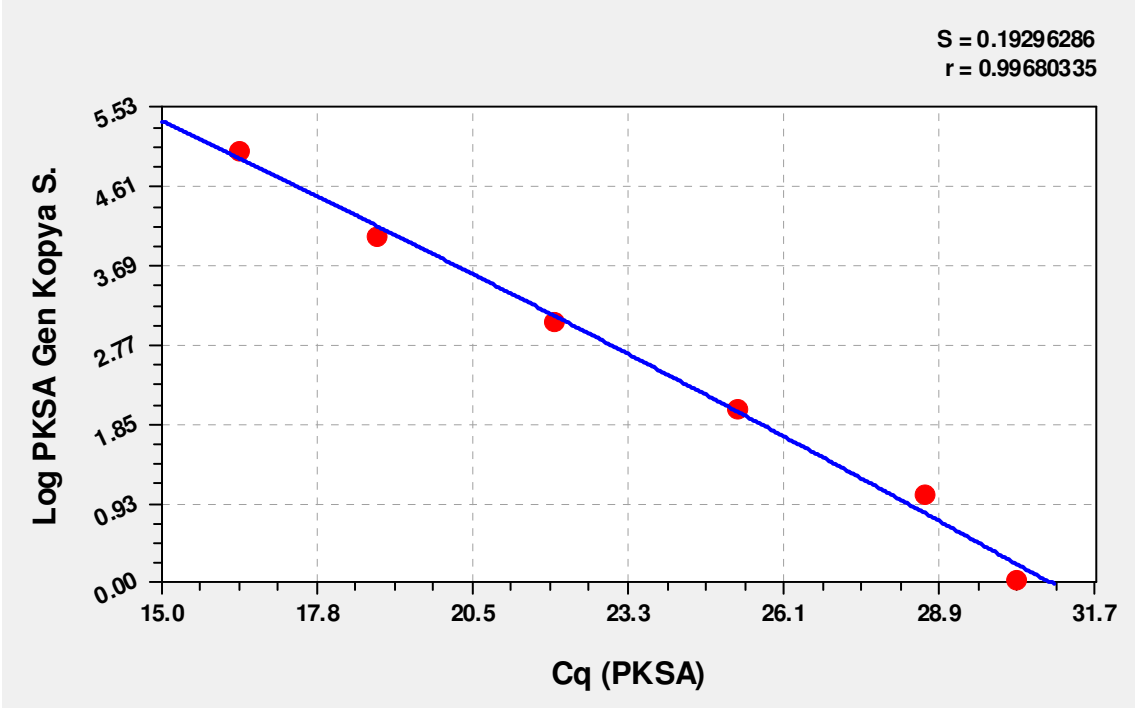
a = 9.61654627662
b = - 0.256914240437
c = - 0.00177002280013



Şekil 3.32. Log *AflR* Gen Kopya Sayıları İle Cq Değerleri Arasındaki İlişkiyi Gösteren Kuadratik Grafik



Şekil 3.33. Log *Nor-1* Gen Kopya Sayıları İle Cq Değerleri Arasındaki İlişkiyi Gösteren Kuadratik Grafik



Şekil 3.34. Log *PksA* Gen Kopya Sayıları İle Cq Değerleri Arasındaki İlişkiyi Gösteren Kuadratik Grafik

Çalışmada, 4 farklı su aktivitesi ve 4 farklı sıcaklıkta 20 gün depolanan kontamine kırmızıbiberlerden ekstrakte edilen RNA numunelerinde ekspres olan söz konusu genlerin kopya sayıları, yukarda verilen grafikler ve denklemler yardımıyla PZR sonucu elde edilen Cq değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Logaritmik olarak hesaplanan gen kopya sayıları, *aflR*, *nor-1* ve *pksA* genleri için, sırasıyla Tablo 3.6, Tablo 3.7 ve Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayıları*

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	Sıcaklık			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	2.33±0.06	2.33±0.06	2.33±0.06	2.33±0.06
	1	2.48±0.06	2.49±0.03	2.80±0.06	2.64±0.09
	2	2.69±0.07	2.32±0.06	3.21±0.18	2.99±0.09
	3	2.81±0.01	2.24±0.05	3.38±0.23	2.85±0.06
	4	2.52±0.07	2.13±0.12	3.33±0.13	3.19±0.16
	5	2.40±0.06	2.46±0.11	3.14±0.03	2.89±0.27
	7	2.25±0.05	2.78±0.13	3.00±0.06	2.65±0.37
	10	2.64±0.03	2.41±0.18	2.66±0.03	2.27±0.15
	15	2.42±0.07	2.49±0.14	2.39±0.05	2.62±0.05
	20	2.20±0.04	2.17±0.06	2.85±0.06	2.83±0.09
	Ortalama	2.47±0.19^{Bc}	2.38±0.21^{Cc}	2.91±0.37^{Aa}	2.72±0.32^{Ab}
0.85	0	2.33±0.06	2.33±0.06	2.33±0.06	2.33±0.06
	1	2.43±0.41	2.54±0.41	2.80±0.16	2.84±0.16
	2	2.74±0.23	3.07±0.18	2.99±0.03	2.90±0.15
	3	2.87±0.21	3.40±0.01	2.91±0.25	3.25±0.30
	4	3.19±0.12	3.26±0.02	3.52±0.13	2.93±0.44
	5	2.77±0.21	3.09±0.15	3.45±0.12	3.07±0.18
	7	2.90±0.44	3.21±0.06	3.31±0.19	2.78±0.20
	10	2.96±0.25	2.78±0.20	3.07±0.23	2.45±0.23
	15	2.80±0.20	2.51±0.24	2.79±0.21	2.27±0.26
	20	2.18±0.31	2.18±0.35	2.42±0.23	2.42±0.27
	Ortalama	2.79±0.43^{Aa}	2.84±0.46^{Aa}	3.00±0.43^{Aa}	2.72±0.40^{Aa}
0.90	0	2.45±0.13	2.45±0.13	2.45±0.13	2.45±0.13
	1	2.82±0.39	2.95±0.44	2.78±0.08	2.46±0.21
	2	2.75±0.32	3.01±0.31	2.71±0.12	2.59±0.42
	3	2.60±0.27	3.07±0.26	3.12±0.51	3.20±0.61
	4	2.65±0.10	2.78±0.17	3.27±0.01	3.68±0.04
	5	2.37±0.31	2.78±0.32	3.64±0.18	3.51±0.19
	7	2.46±0.40	2.80±0.29	3.05±0.38	3.11±0.04
	10	2.11±0.54	2.41±0.36	2.96±0.18	2.59±0.20
	15	1.95±0.34	2.64±0.14	3.18±0.33	2.94±0.25
	20	1.63±0.25	2.37±0.32	3.29±0.40	2.62±0.24
	Ortalama	2.38±0.49^{BCb}	2.72±0.37^{ABa}	3.00±0.42^{Aa}	2.91±0.51^{Aa}
0.95	0	2.45±0.13	2.45±0.13	2.45±0.13	2.45±0.13
	1	2.26±0.18	2.63±0.15	2.72±0.06	2.21±0.09
	2	2.24±0.17	2.79±0.20	3.03±0.06	2.73±0.18
	3	2.05±0.30	2.53±0.17	3.38±0.00	2.89±0.21
	4	2.21±0.19	2.44±0.13	3.48±0.28	3.22±0.47
	5	2.44±0.18	2.88±0.10	3.49±0.08	3.36±0.23
	7	2.37±0.10	2.39±0.17	3.25±0.65	3.15±0.14
	10	2.22±0.29	2.52±0.12	3.13±0.18	2.78±0.15
	15	1.96±0.18	2.76±0.32	3.05±0.33	2.28±0.11
	20	1.53±0.02	2.31±0.35	2.84±0.17	2.07±0.14
	Ortalama	2.17±0.32^{Cb}	2.57±0.27^{BCb}	2.99±0.44^{Aa}	2.71±0.48^{Aa}

*: Ortalama±standart sapma; A-C: Farklı harfler, aynı sütun için, o sütüna ait sıcaklık seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).; a-c: Farklı harfler, aynı satır için, o satıra ait su aktivitesi seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 3.7. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayıları*

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	Sıcaklık			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	1.91±0.07	1.91±0.07	1.91±0.07	1.91±0.07
	1	1.81±0.15	1.93±0.13	1.93±0.11	1.97±0.02
	2	2.18±0.20	2.24±0.11	2.25±0.08	2.50±0.03
	3	2.29±0.03	2.64±0.10	2.51±0.12	2.60±0.12
	4	2.70±0.13	2.87±0.16	3.12±0.32	2.68±0.19
	5	2.33±0.06	2.62±0.09	2.93±0.27	2.81±0.29
	7	2.24±0.04	2.50±0.03	2.76±0.20	2.63±0.31
	10	1.97±0.04	2.33±0.00	2.51±0.21	2.46±0.17
	15	1.96±0.05	2.19±0.02	2.49±0.08	2.40±0.11
	20	1.89±0.09	2.02±0.05	2.24±0.02	2.64±0.04
	Ortalama	2.12±0.28^{BCb}	2.32±0.32^{Bab}	2.46±0.42^{Ba}	2.46±0.33^{Ba}
0.85	0	1.91±0.07	1.91±0.07	1.91±0.07	1.91±0.07
	1	1.97±0.12	2.22±0.32	2.53±0.38	2.24±0.29
	2	2.27±0.09	2.37±0.27	2.59±0.19	2.64±0.12
	3	2.42±0.06	2.56±0.12	2.83±0.04	2.81±0.06
	4	2.67±0.11	2.61±0.20	2.87±0.14	3.06±0.24
	5	2.60±0.14	3.04±0.02	3.42±0.11	3.46±0.03
	7	2.50±0.06	3.03±0.26	3.34±0.23	3.80±0.01
	10	2.56±0.07	2.94±0.29	3.44±0.09	4.33±0.15
	15	2.47±0.21	2.71±0.20	3.95±0.05	4.78±0.04
	20	2.26±0.20	2.40±0.16	4.56±0.04	4.63±0.13
	Ortalama	2.32±0.27^{ABb}	2.58±0.41^{ABb}	3.14±0.74^{Aa}	3.36±0.96^{Aa}
0.90	0	1.88±0.01	1.88±0.01	1.88±0.01	1.88±0.01
	1	1.87±0.28	2.06±0.06	1.73±0.11	1.86±0.07
	2	1.64±0.07	2.16±0.14	1.93±0.16	1.92±0.17
	3	1.54±0.29	2.41±0.17	2.26±0.10	2.47±0.38
	4	2.76±0.35	3.30±0.15	4.32±0.16	4.14±0.20
	5	3.00±0.40	3.69±0.63	4.63±0.05	4.40±0.13
	7	2.31±0.52	3.92±0.27	4.20±0.12	4.08±0.24
	10	1.59±0.38	3.46±0.69	4.54±0.15	4.10±0.11
	15	1.35±0.07	2.39±0.22	5.07±0.08	4.12±0.09
	20	0.80±0.35	2.08±0.11	4.61±0.13	4.44±0.05
	Ortalama	1.87±0.70^{Cc}	2.73±0.80^{Ab}	3.52±1.31^{Aa}	3.34±1.10^{Aab}
0.95	0	1.88±0.01	1.88±0.01	1.88±0.01	1.88±0.01
	1	1.87±0.02	2.01±0.24	1.92±0.03	1.94±0.04
	2	2.31±0.01	2.34±0.12	3.23±0.15	2.69±0.06
	3	2.40±0.33	2.53±0.40	4.05±0.20	3.45±0.09
	4	2.18±0.03	2.68±0.05	4.34±0.09	3.74±0.08
	5	2.44±0.12	2.92±0.21	4.51±0.02	3.85±0.03
	7	3.12±0.36	3.52±0.15	4.56±0.12	4.01±0.07
	10	3.20±0.37	3.74±0.02	4.24±0.12	3.88±0.16
	15	3.44±0.21	3.61±0.26	3.88±0.18	4.05±0.11
	20	2.99±0.23	3.32±0.18	3.68±0.16	4.16±0.23
	Ortalama	2.58±0.58^{Ab}	2.85±0.67^{Ab}	3.63±0.95^{Aa}	3.36±0.84^{Aa}

*: Ortalama±standart sapma; A-C: Farklı harfler, aynı sütun için, o sütüna ait sıcaklık seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).; a-c: Farklı harfler, aynı satır için, o satıra ait su aktivitesi seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 3.8. Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayıları*

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	Sıcaklık			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	2.05±0.11	2.05±0.11	2.05±0.11	2.05±0.11
	1	2.09±0.04	2.07±0.04	2.16±0.05	2.30±0.11
	2	1.82±0.04	2.15±0.07	2.19±0.03	2.36±0.09
	3	2.11±0.10	2.17±0.02	2.60±0.09	2.75±0.13
	4	2.18±0.04	2.25±0.06	2.63±0.09	2.92±0.06
	5	1.55±0.15	1.98±0.03	2.33±0.01	2.67±0.09
	7	1.40±0.08	1.99±0.10	2.17±0.09	2.63±0.12
	10	1.14±0.24	1.82±0.09	1.92±0.03	2.49±0.12
	15	1.02±0.19	1.76±0.01	1.77±0.08	2.32±0.17
	20	1.06±0.06	1.66±0.01	1.68±0.04	2.36±0.16
	Ortalama	1.64±0.46^{Cc}	1.99±0.19^{Cb}	2.15±0.31^{Cb}	2.48±0.27^{Ca}
0.85	0	2.05±0.11	2.05±0.11	2.05±0.11	2.05±0.11
	1	2.01±0.06	2.06±0.08	2.13±0.09	2.59±0.13
	2	1.97±0.12	2.19±0.04	2.63±0.06	3.02±0.03
	3	2.19±0.07	2.52±0.09	2.93±0.10	3.05±0.20
	4	2.24±0.09	3.13±0.08	3.24±0.20	3.00±0.07
	5	2.77±0.12	3.26±0.02	3.59±0.06	3.76±0.10
	7	2.40±0.12	3.42±0.14	3.92±0.10	3.65±0.00
	10	1.93±0.06	3.07±0.04	4.28±0.13	3.63±0.41
	15	1.70±0.05	2.20±0.09	4.26±0.12	3.74±0.15
	20	1.55±0.07	1.72±0.06	4.30±0.23	3.67±0.04
	Ortalama	2.08±0.34^{Bc}	2.56±0.58^{Bb}	3.33±0.84^{Ba}	3.21±0.57^{Ba}
0.90	0	2.05±0.06	2.05±0.06	2.05±0.06	2.05±0.06
	1	2.16±0.06	2.21±0.05	2.27±0.09	2.75±0.26
	2	1.99±0.01	2.15±0.16	3.43±0.13	3.09±0.26
	3	2.32±0.17	2.92±0.17	4.67±0.13	4.20±0.26
	4	2.74±0.19	3.24±0.34	4.76±0.05	4.17±0.04
	5	2.76±0.22	3.41±0.05	4.47±0.11	3.81±0.12
	7	2.73±0.00	3.06±0.07	4.67±0.03	4.27±0.06
	10	2.74±0.36	4.00±0.31	4.92±0.16	4.39±0.15
	15	1.91±0.41	3.99±0.12	5.05±0.03	4.75±0.04
	20	1.48±0.40	4.15±0.23	5.30±0.01	4.76±0.13
	Ortalama	2.29±0.49^{ABc}	3.12±0.77^{Ab}	4.16±1.11^{Aa}	3.82±0.87^{Aa}
0.95	0	2.05±0.06	2.05±0.06	2.05±0.06	2.05±0.06
	1	2.06±0.13	2.08±0.15	2.68±0.01	3.01±0.11
	2	2.30±0.15	2.70±0.11	3.30±0.26	2.85±0.32
	3	2.81±0.12	2.91±0.12	4.20±0.00	3.58±0.21
	4	2.90±0.14	3.12±0.11	4.20±0.15	3.57±0.10
	5	2.96±0.13	2.90±0.21	4.27±0.05	3.88±0.14
	7	2.67±0.13	3.59±0.12	4.37±0.07	4.07±0.12
	10	2.24±0.09	3.76±0.17	4.33±0.04	4.10±0.06
	15	2.11±0.07	3.72±0.01	4.29±0.06	4.14±0.02
	20	1.90±0.09	3.63±0.06	4.47±0.06	4.37±0.05
	Ortalama	2.40±0.39^{Ac}	3.04±0.62^{Ab}	3.81±0.81^{ABa}	3.56±0.70^{ABa}

*: Ortalama±standart sapma; A-C: Farklı harfler, aynı sütun için, o sütüna ait sıcaklık seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).; a-c: Farklı harfler, aynı satır için, o satıra ait su aktivitesi seviyesinde veriler arası istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın *aflR* gen ekspresyonu üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.9'da verilmiştir. Tablo 3.9'da verilen tahminleyiciler, *aflR* gen ekspresyonundaki değişkenliğin sadece yaklaşık %32'sini açıklayabilmektedir. Bu tabloda görüldüğü gibi, doğrusal modelde *aflR* gen ekspresyonu üzerine su aktivitesinin etkisi önemsiz ($p>0.05$) bulunurken, sıcaklık ve zamanın etkisi oldukça önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Ayrıca, su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın kuadratik modelde etkilerinin oldukça önemli ($p<0.01$), su aktivitesi-sıcaklık interaksiyon etkisinin önemli ($p<0.05$), su aktivitesi-zaman ve sıcaklık-zaman interaksiyon etkilerinin ise önemsiz ($p>0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3.9. Su Aktivitesi, Sıcaklık ve Zamanın *AflR* Gen Ekspresyonu Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	9	2.43815	16.48	0.000
X_1 (Su Aktivitesi)	1	0.07758	0.52	0.470
X_2 (Sıcaklık)	1	6.60950	44.68	0.000
X_3 (Zaman)	1	3.49591	23.63	0.000
X_1*X_1	1	2.60107	17.58	0.000
X_2*X_2	1	2.89879	19.60	0.000
X_3*X_3	1	5.76578	38.98	0.000
X_1*X_2	1	0.89371	6.04	0.015
X_1*X_3	1	0.02804	0.19	0.664
X_2*X_3	1	0.41297	2.79	0.096
Saf Hata	160	0.10819		
Toplam	319			
R^2	%32.36			
R^2_{adj}	%30.40			
R^2_{pred}	%28.16			

SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2(adj): Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2 (pred): Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

Su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın *nor-1* gen ekspresyonu üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.10'da verilmiştir. Tablo 3.10'da verilen tahminleyiciler *nor-1* gen ekspresyonundaki değişkenliğin yaklaşık %65'ini açıklayabilmektedir. Bu tabloda görüldüğü gibi, su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın doğrusal modelde *nor-1* gen ekspresyonu üzerine etkileri oldukça önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Varyans analiz sonuçlarından, su aktivitesinin kuadratik etkisinin önemli ($p<0.05$) olduğu görülürken,

sıcaklık ve zamanın kuadratik etkilerinin ve su aktivitesi-sıcaklık, su aktivitesi-zaman ve sıcaklık-zaman interaksiyon etkilerinin de çok önemli ($p<0.01$) olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 3.10. Su Aktivitesi, Sıcaklık ve Zamanın *Nor-1* Gen Ekspresyonu Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	9	18.7324	64.59	0.000
X_1 (Su Aktivitesi)	1	28.2246	97.33	0.000
X_2 (Sıcaklık)	1	59.4338	204.94	0.000
X_3 (Zaman)	1	25.7533	88.80	0.000
X_1*X_1	1	1.5240	5.26	0.023
X_2*X_2	1	3.9201	13.52	0.000
X_3*X_3	1	39.3264	135.61	0.000
X_1*X_2	1	2.8509	9.83	0.002
X_1*X_3	1	7.1866	24.78	0.000
X_2*X_3	1	17.4089	60.03	0.000
Saf Hata	160	0.0690		
Toplam	319			
R^2	%65.22			
R^2_{adj}	%64.21			
R^2_{pred}	%62.68			

SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

Su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın *pksA* gen ekspresyonu üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.11'de verilmiştir. Tablo 3.11'de verilen tahminleyiciler *pksA* gen ekspresyonundaki değişkenliğin yaklaşık %65'ini açıklayabilmektedir. Bu tabloda görüldüğü gibi, tüm faktörlerin *pksA* gen ekspresyonu üzerine tek tek, kuadratik ve interaksiyon etkilerinin çok önemli ($p<0.01$) olduğu bulunmuştur.

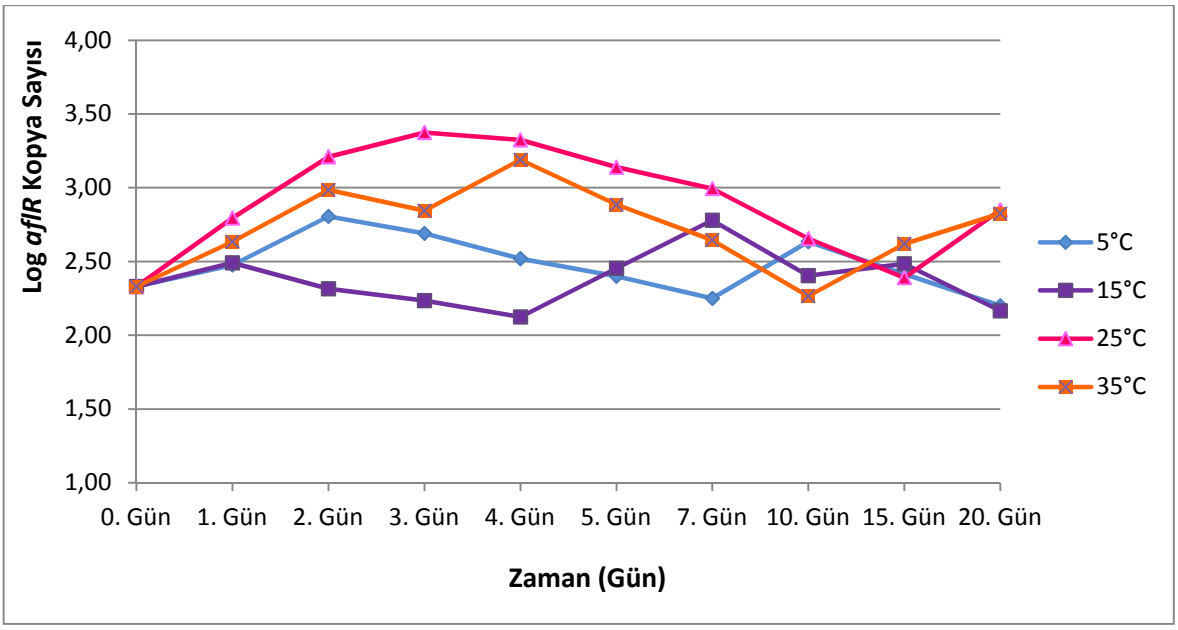
Tablo 3.11. Su Aktivitesi, Sıcaklık ve Zamanın *PksA* Gen Ekspresyonu Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	9	25.5852	113.84	0.000
X_1 (Su Aktivitesi)	1	77.6673	345.59	0.000
X_2 (Sıcaklık)	1	87.7193	390.31	0.000
X_3 (Zaman)	1	10.9026	48.51	0.000
X_1*X_1	1	15.2033	67.55	0.000
X_2*X_2	1	8.9680	39.90	0.000
X_3*X_3	1	24.0435	106.98	0.000
X_1*X_2	1	1.9105	8.50	0.004
X_1*X_3	1	14.7859	65.79	0.000
X_2*X_3	1	17.5585	78.13	0.000
Saf Hata	160	0.0352		
Toplam	319			
R^2	%76.77			
R^2_{adj}	%76.10			
R^2_{pred}	%75.13			

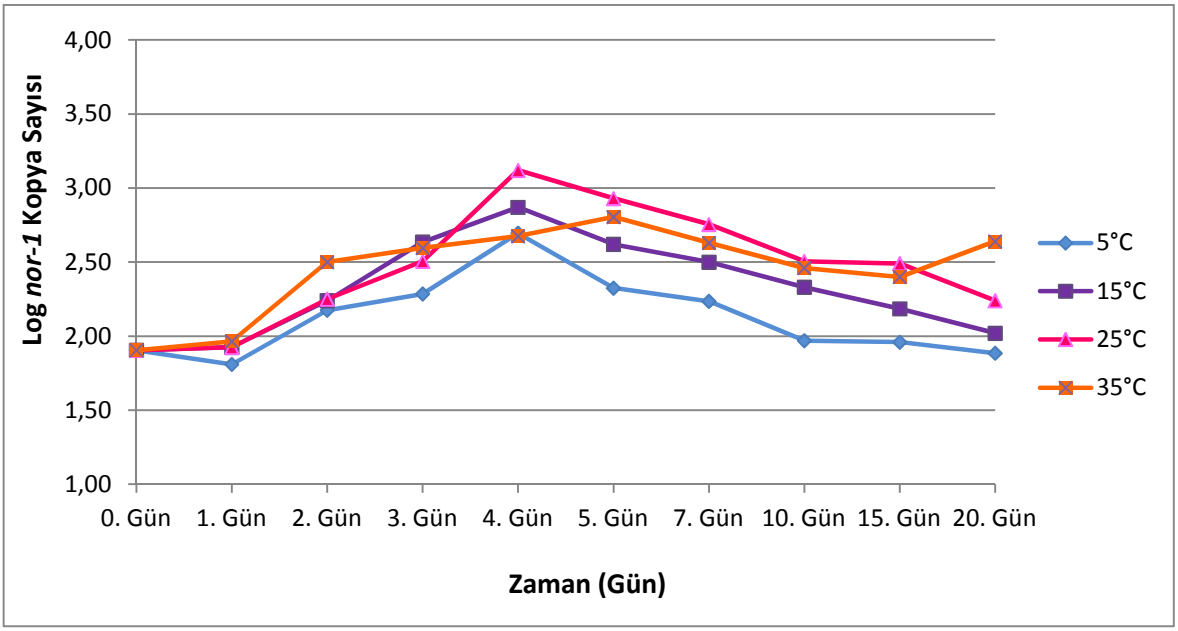
SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

3.3.1. Kontamine Kırmızıbiberlerin *AflR*, *Nor-1* ve *PksA* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Olarak Değişimi

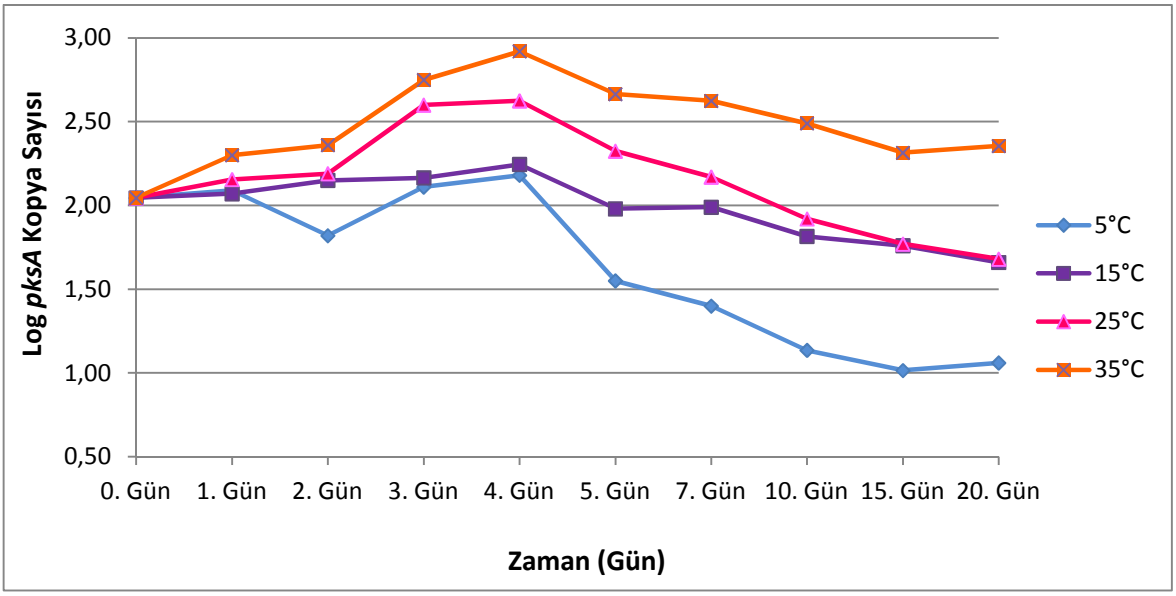
5, 15, 25 ve 35°C'de 20 gün süreyle depolanan 0.80 a_w'ye sahip kontamine kırmızıbiber numunelerinin *aflR*, *nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişimi, sırasıyla Şekil 3.35, Şekil 3.36 ve Şekil 3.37'de grafikle gösterilmiştir.



Şekil 3.35. 0.80 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

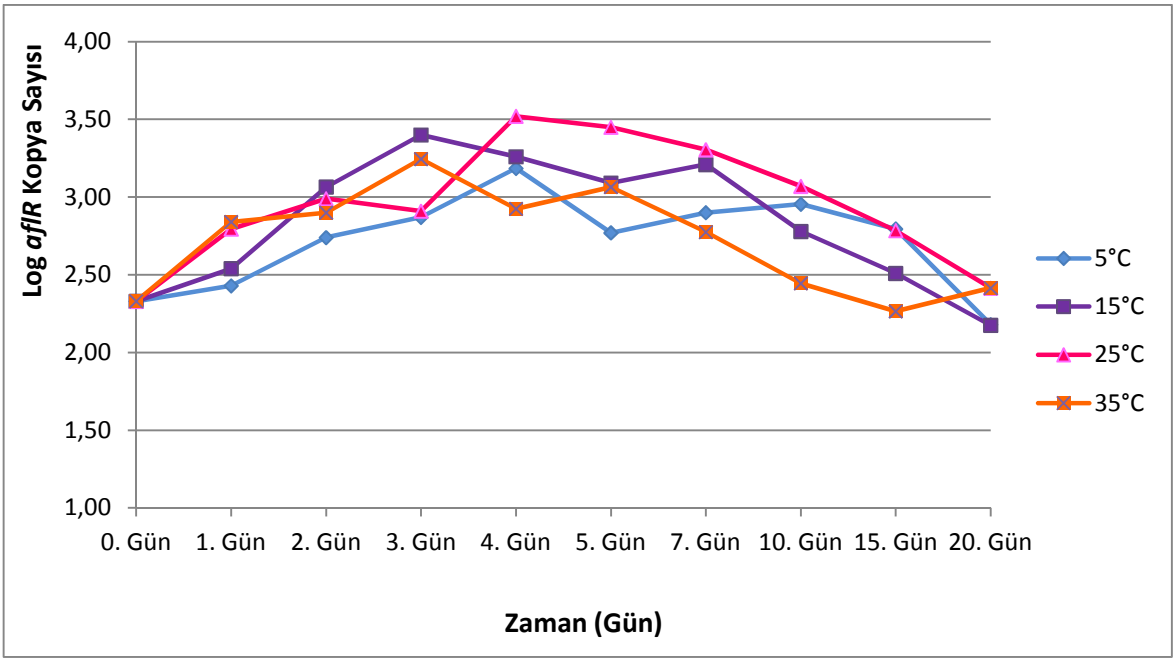


Şekil 3.36. 0.80 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

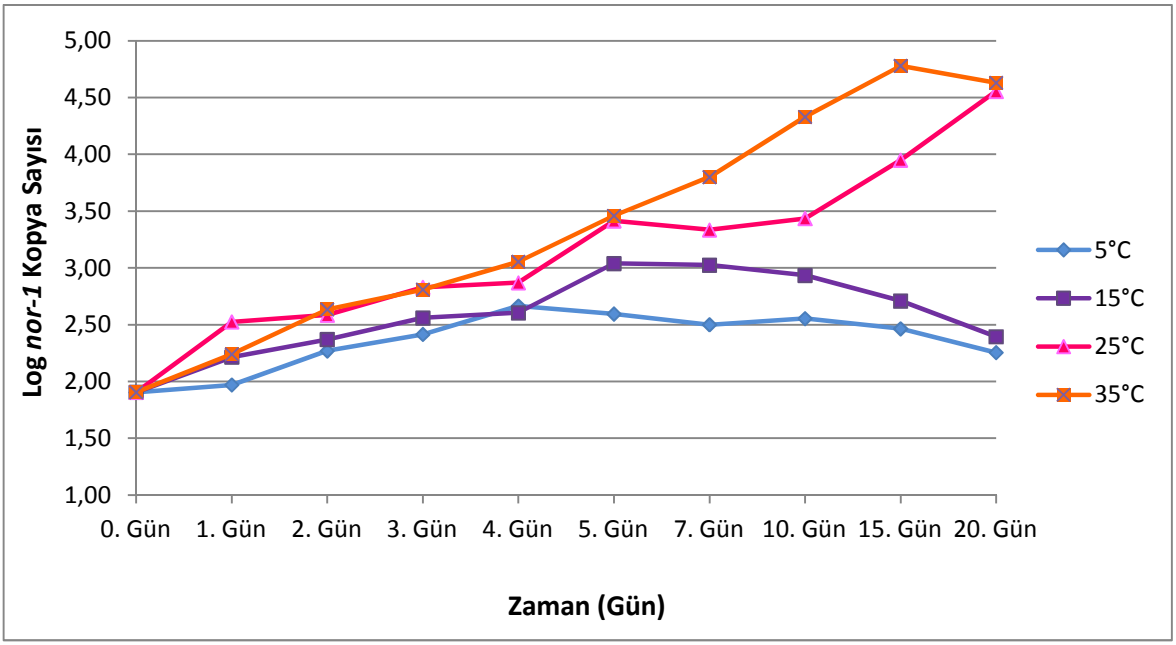


Şekil 3.37. 0.80 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

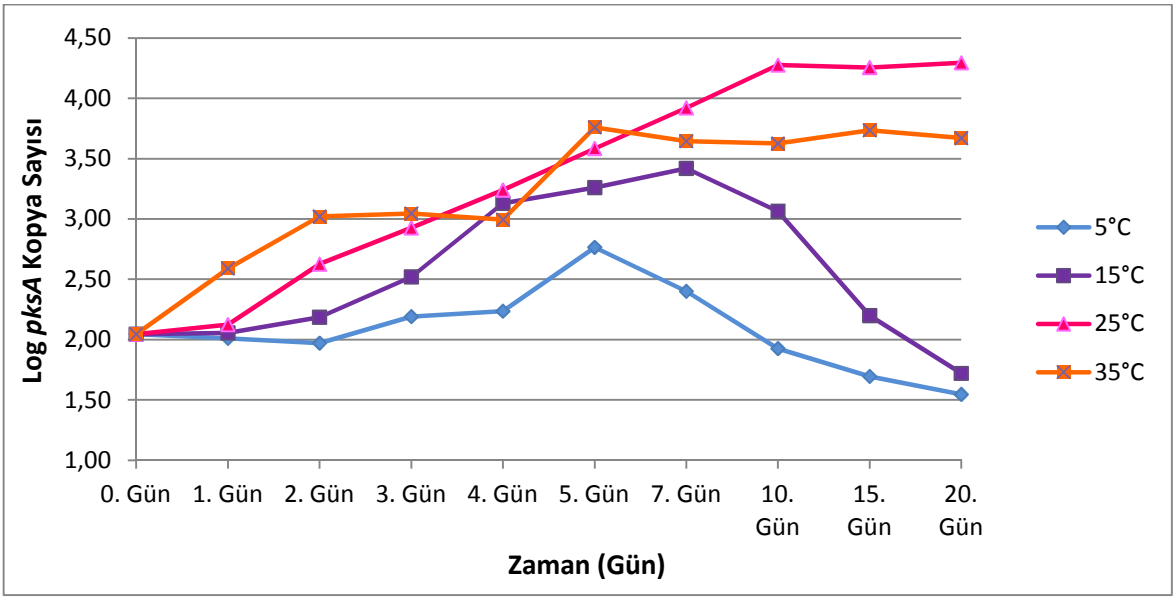
5, 15, 25 ve 35°C'de 20 gün süreyle depolanan 0.85 a_w'ye sahip kontamine kırmızıbiber numunelerinin *aflR*, *nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişimi, sırasıyla Şekil 3.38, Şekil 3.39 ve Şekil 3.40'da grafikle gösterilmiştir.



Şekil 3.38. 0.85 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

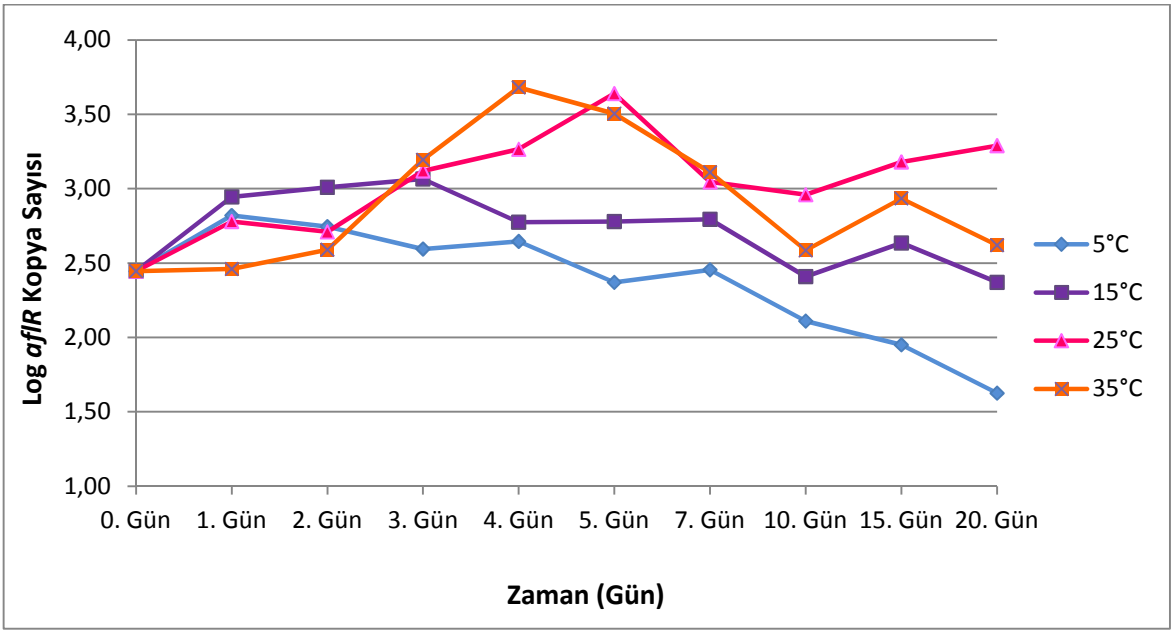


Şekil 3.39. 0.85 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

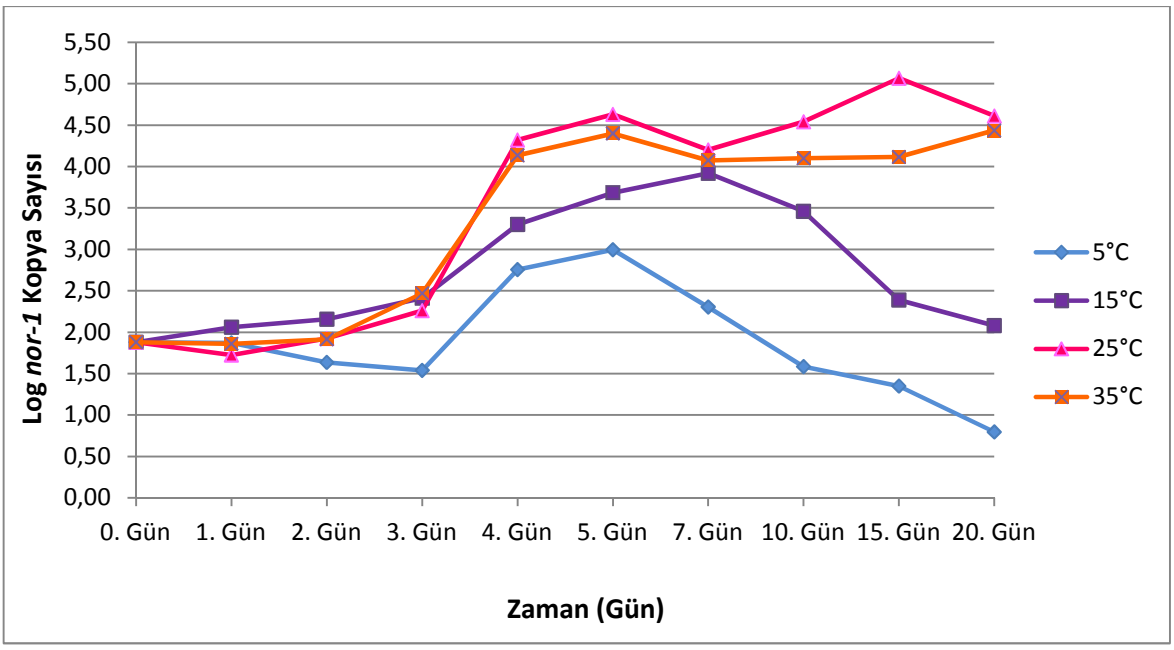


Şekil 3.40. 0.85 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

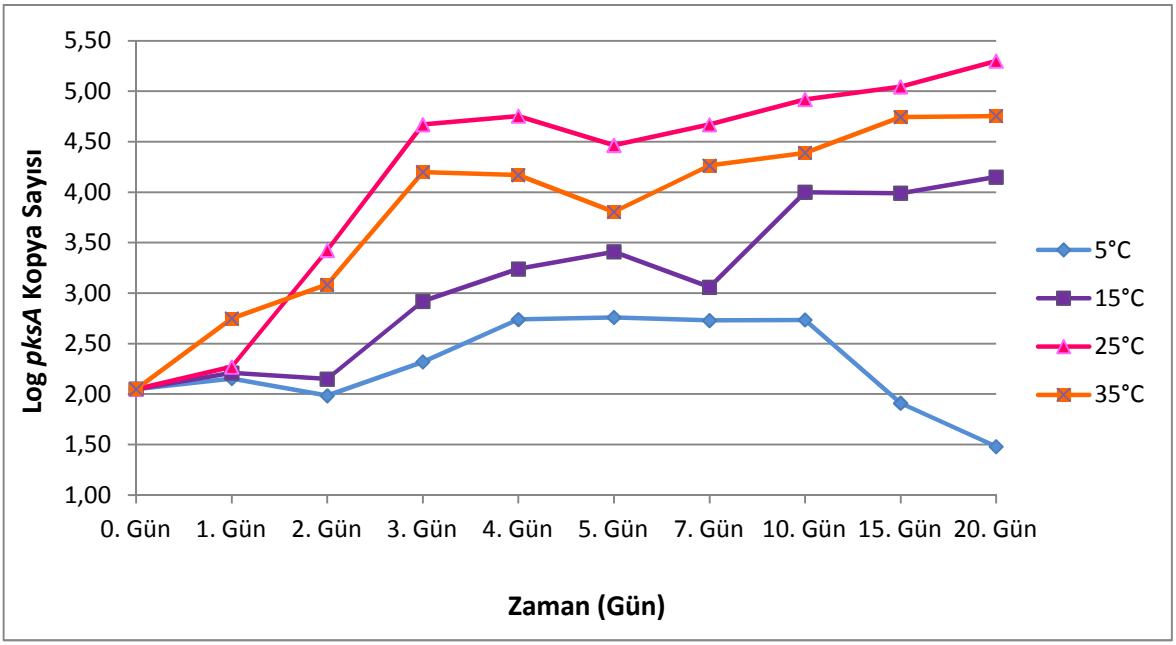
5, 15, 25 ve 35°C'de 20 gün süreyle depolanan 0.90 a_w'ye sahip kontamine kırmızıbiber numunelerinin *aflR*, *nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişimi, sırasıyla Şekil 3.41, Şekil 3.42 ve Şekil 3.43'te grafikle gösterilmiştir.



Şekil 3.41. 0.90 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

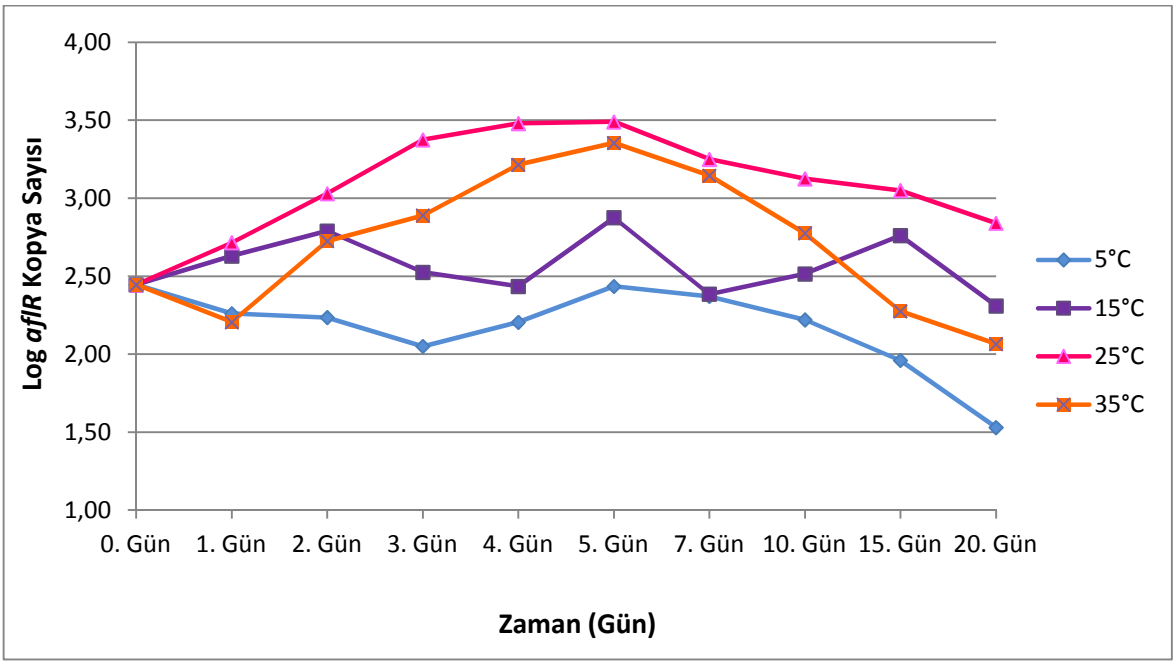


Şekil 3.42. 0.90 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

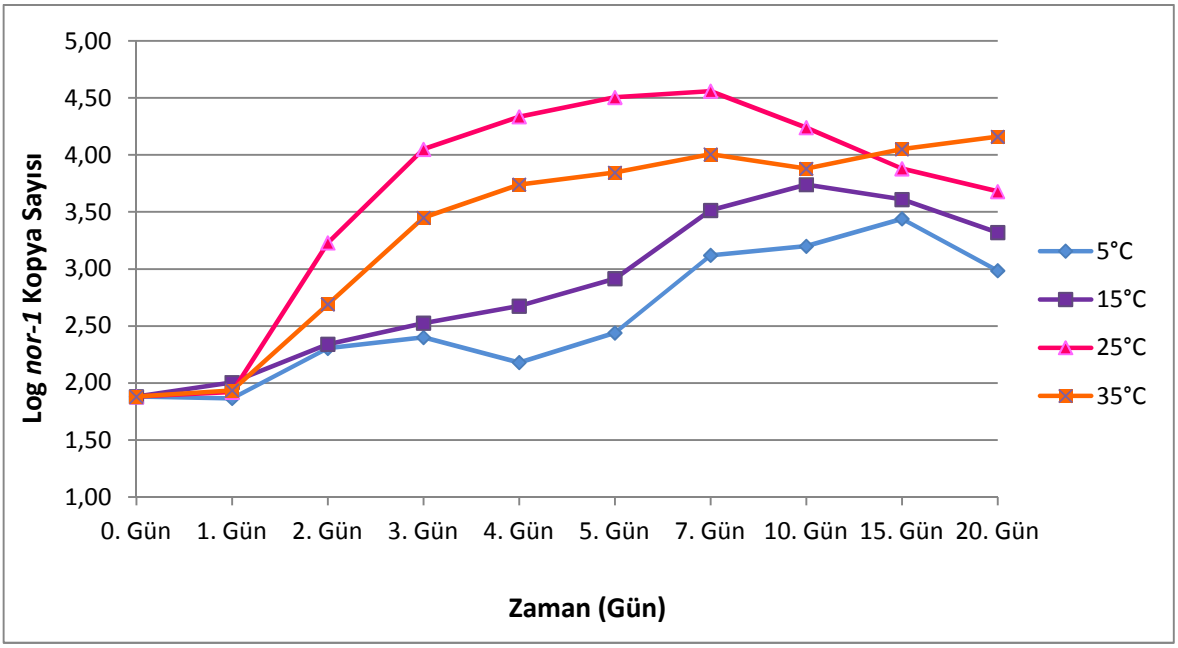


Şekil 3.43. 0.90 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

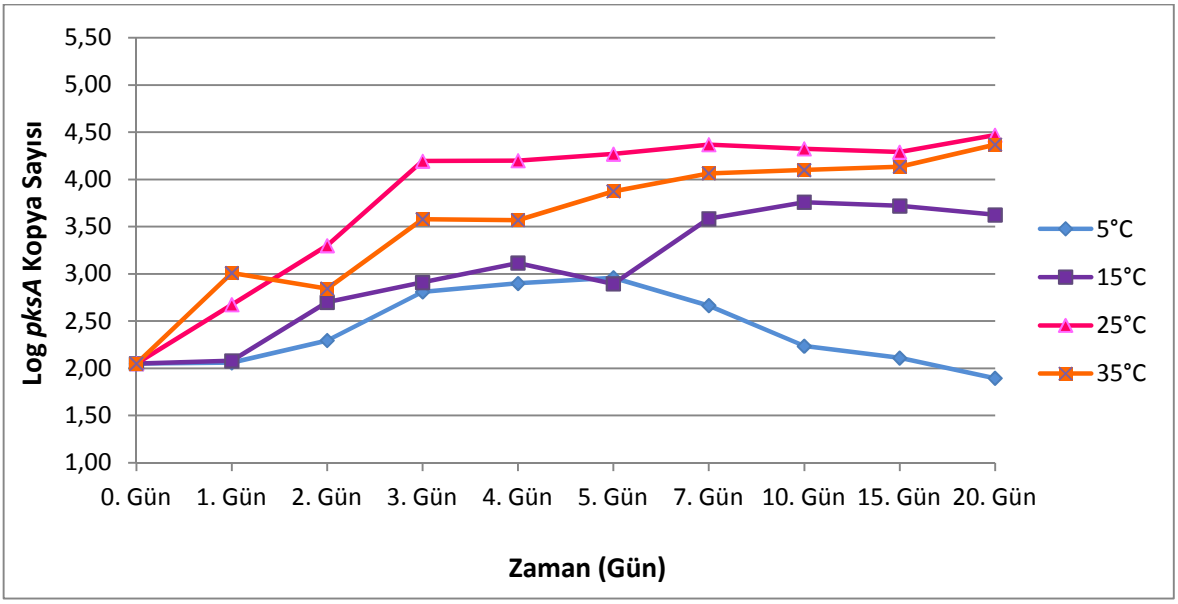
5, 15, 25 ve 35°C'de 20 gün süreyle depolanan 0.95 a_w'ye sahip kontamine kırmızıbiber numunelerinin *aflR*, *nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişimi, sırasıyla Şekil 3.44, Şekil 3.45 ve Şekil 3.46'da grafikle gösterilmiştir.



Şekil 3.44. 0.95 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi



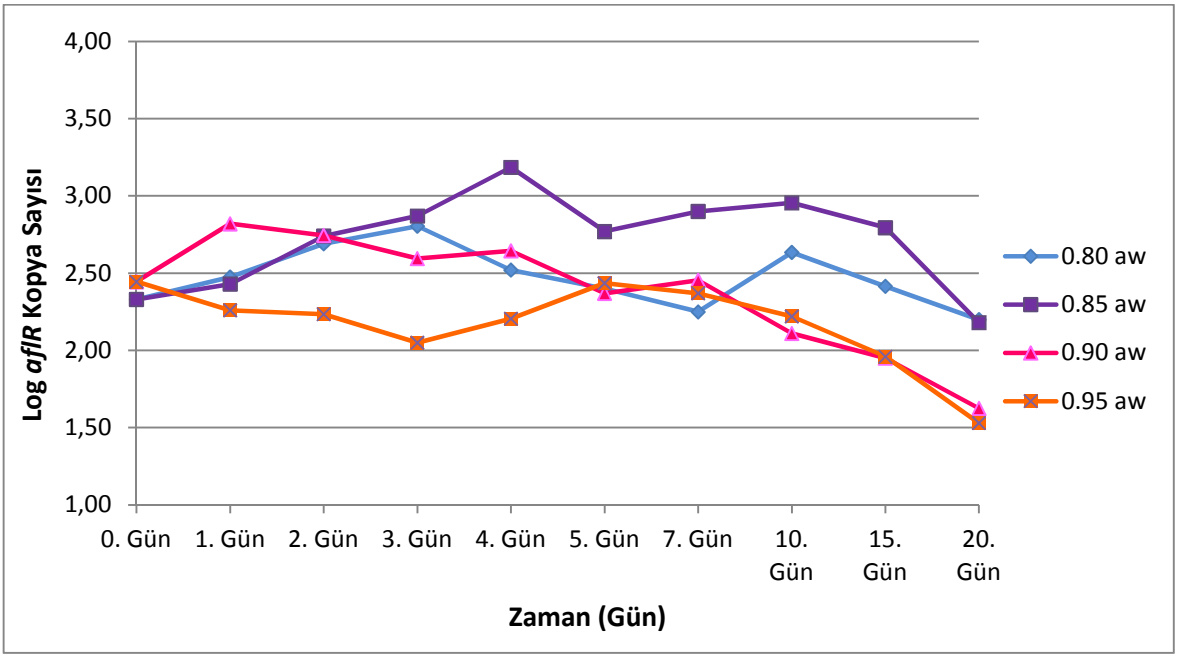
Şekil 3.45. 0.95 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi



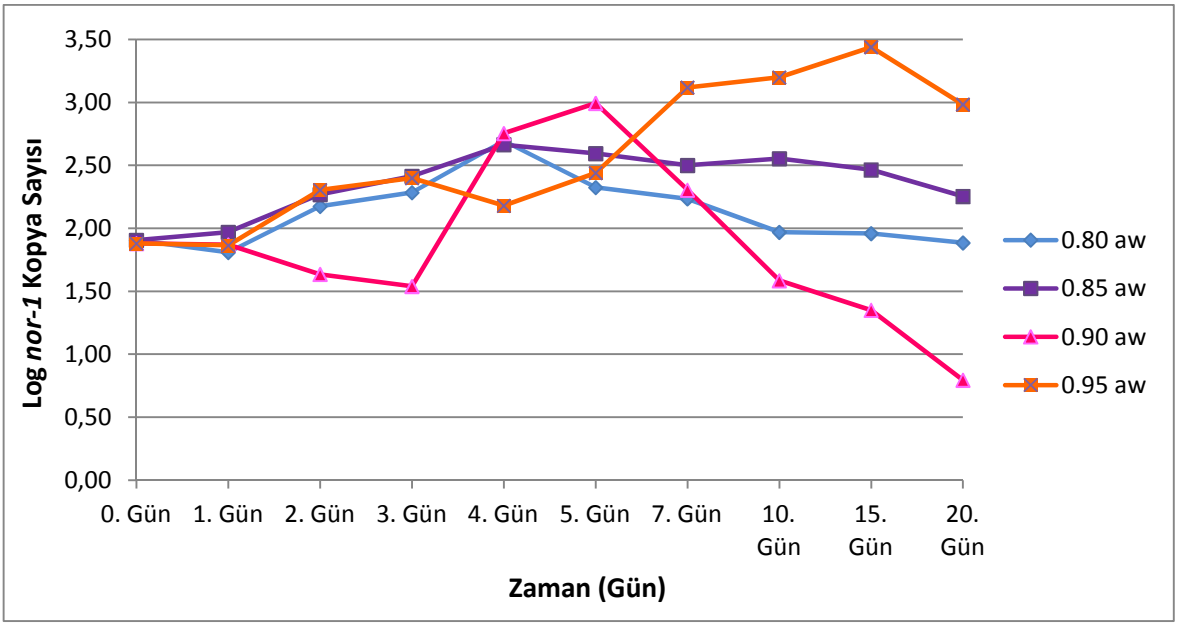
Şekil 3.46. 0.95 a_w'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Sıcaklık ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

3.3.2. Kontamine Kırmızıbiberlerin *AflR, Nor-1* ve *PksA* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

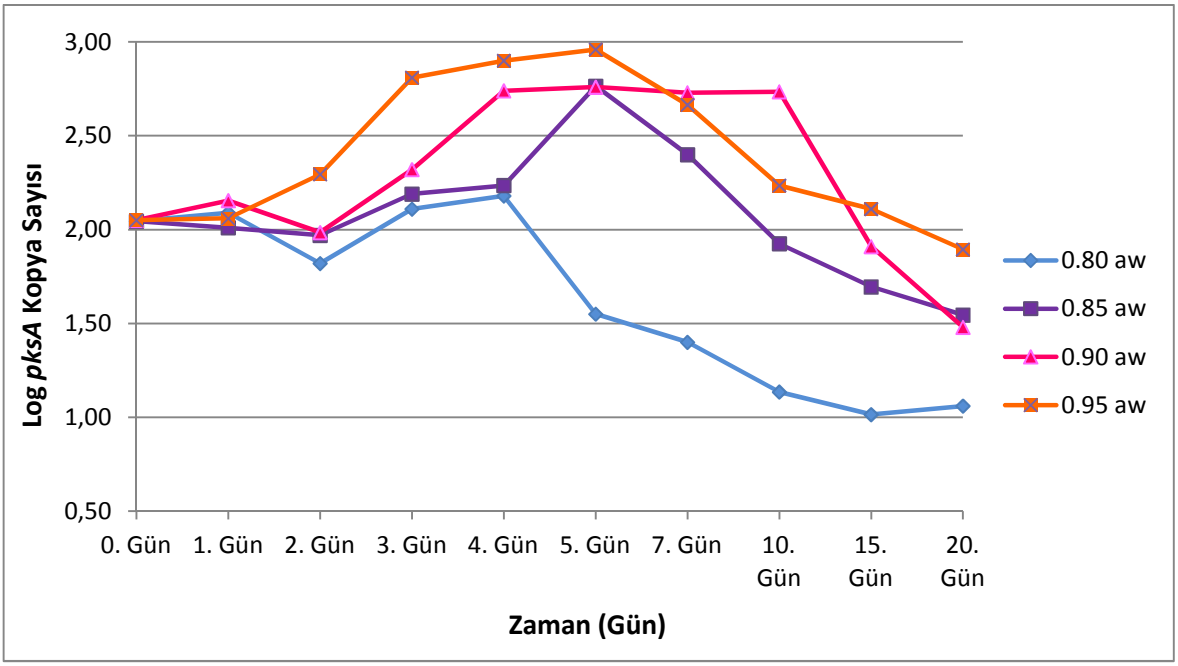
0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95 a_w değerlerinde 5°C'de depolanan kontamine kırmızıbiber numunelerinin *aflR, nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının su aktivitesi ve zamana bağlı olarak değişimi, sırasıyla Şekil 3.47, 3.49 ve 3.49'da grafiklerle gösterilmiştir.



Şekil 3.47. 5°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *AflR* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

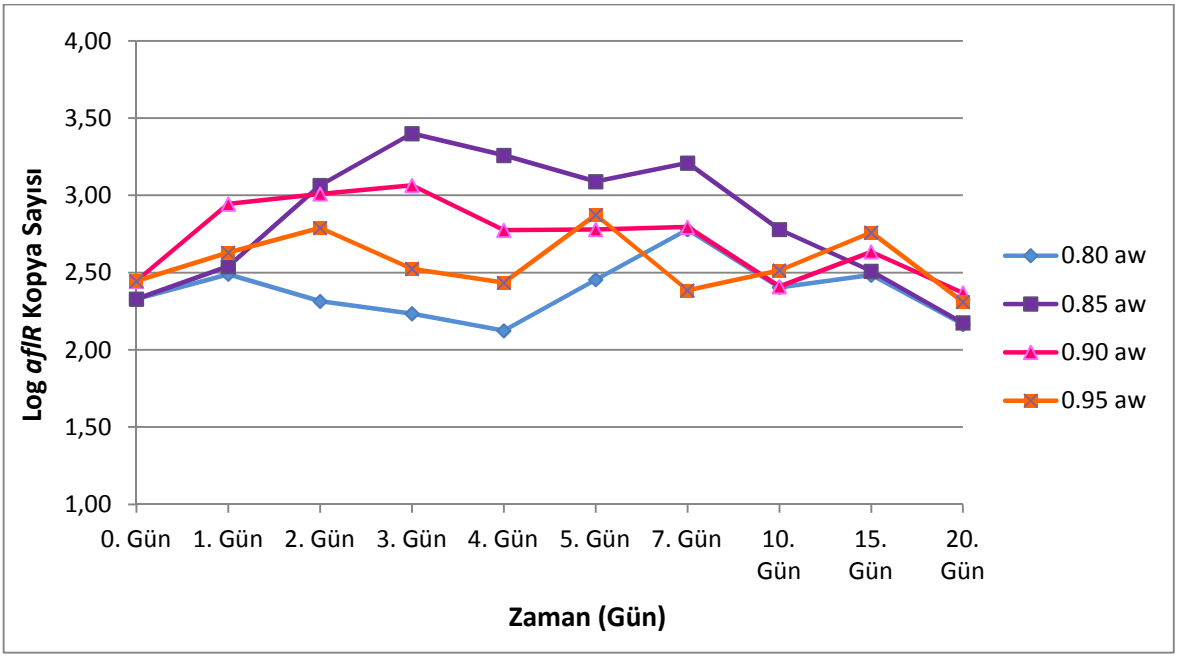


Şekil 3.48. 5°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *Nor-1* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

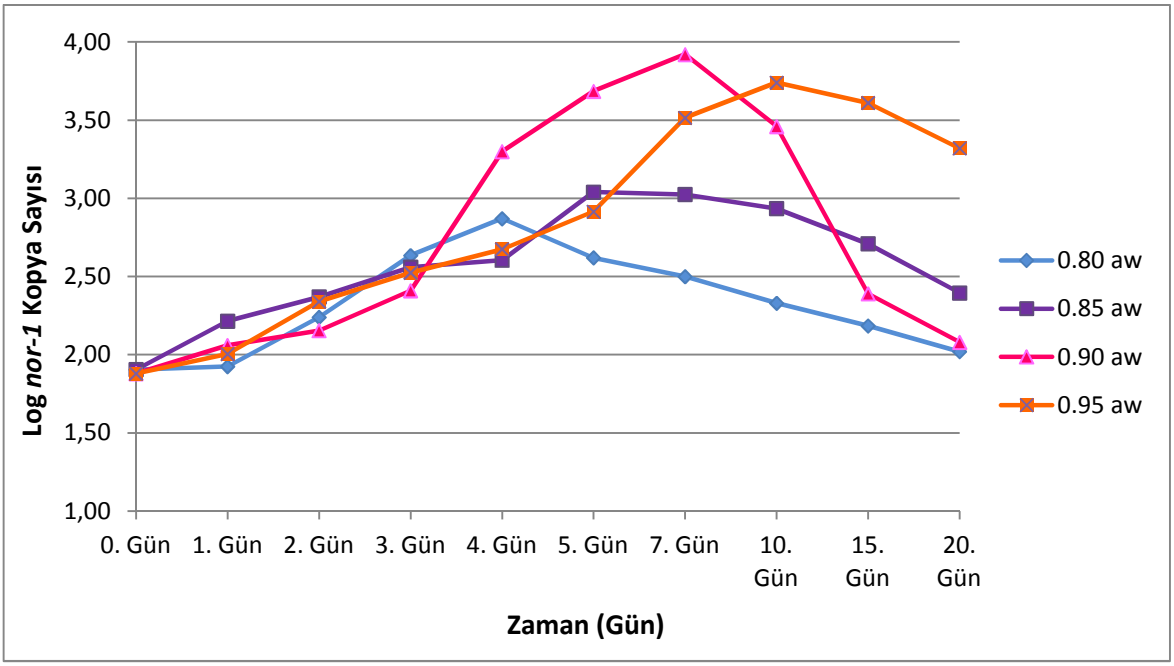


Şekil 3.49. 5°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde Logaritmik *PksA* Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

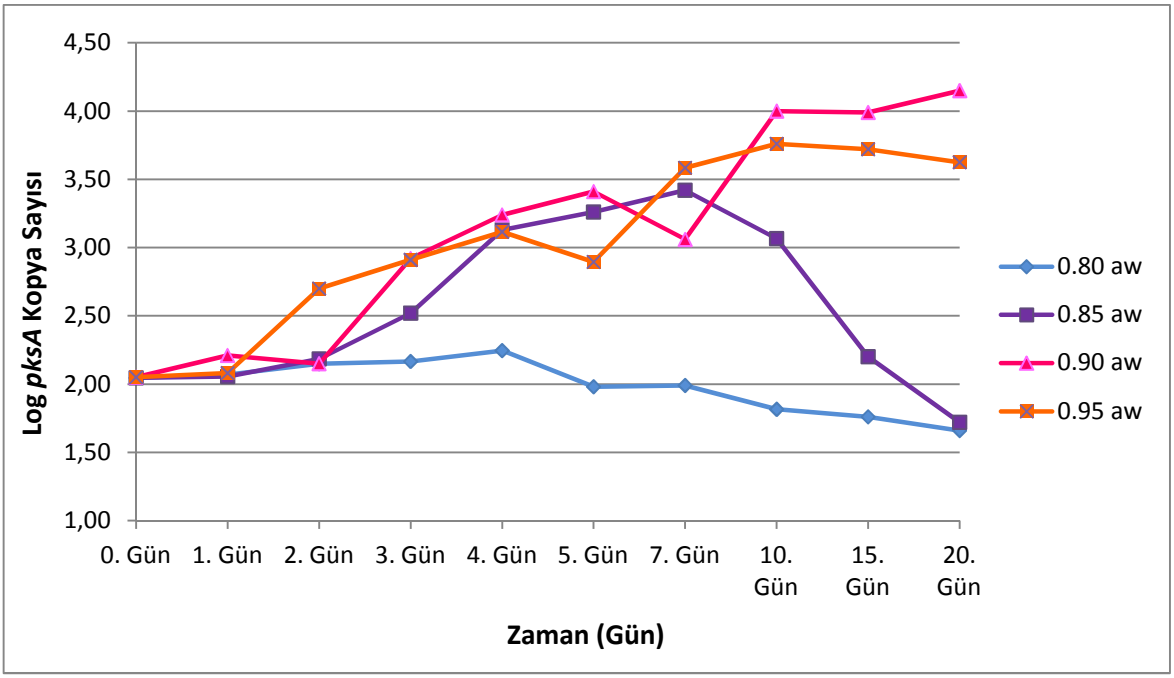
Farklı 4 a_w değerlerinde 20 gün süreyle 5°C'de depolanan kontamine kırmızıbiber numunelerinin *aflR, nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının su aktivitesi ve zamana bağlı olarak değişimi, sırasıyla Şekil 3.50, 3.51 ve 3.52'de grafiklerle gösterilmiştir.



Şekil 3.50. 15°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde *AflR* Logaritmik Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

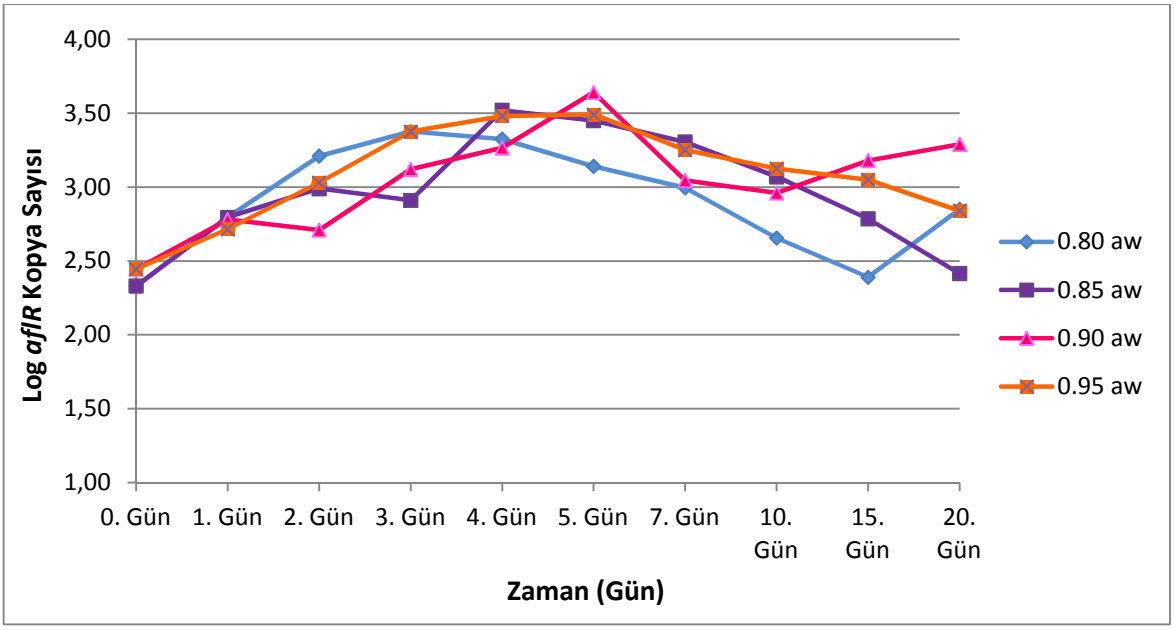


Şekil 3.51. 15°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde *Nor-1* Logaritmik Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

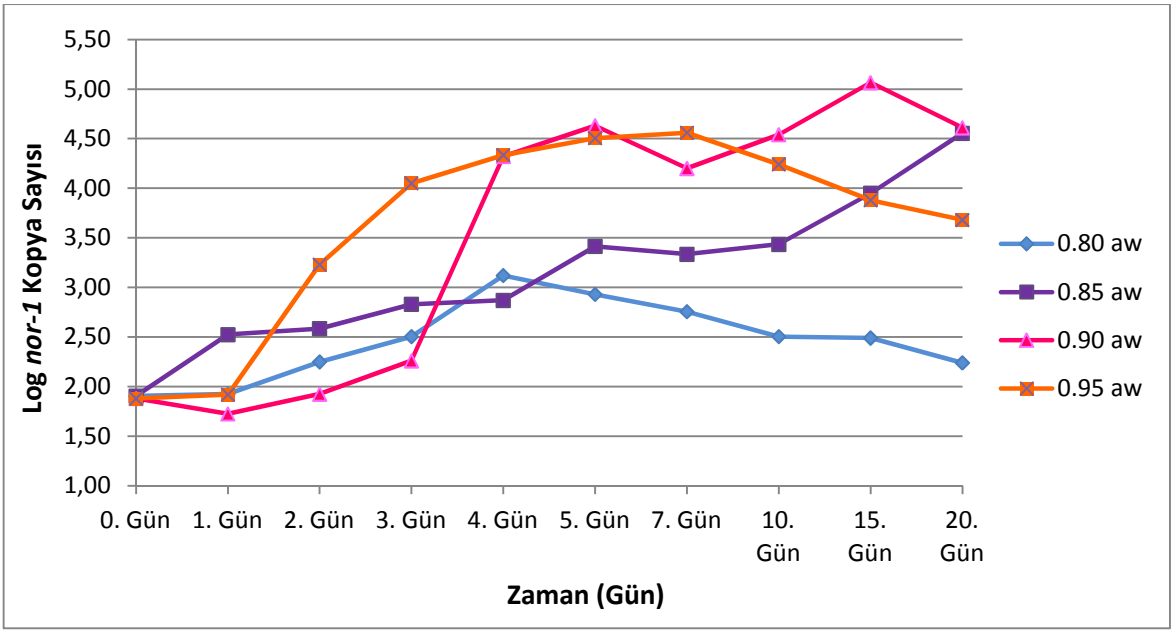


Şekil 3.52. 15°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde *PksA* Logaritmik Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

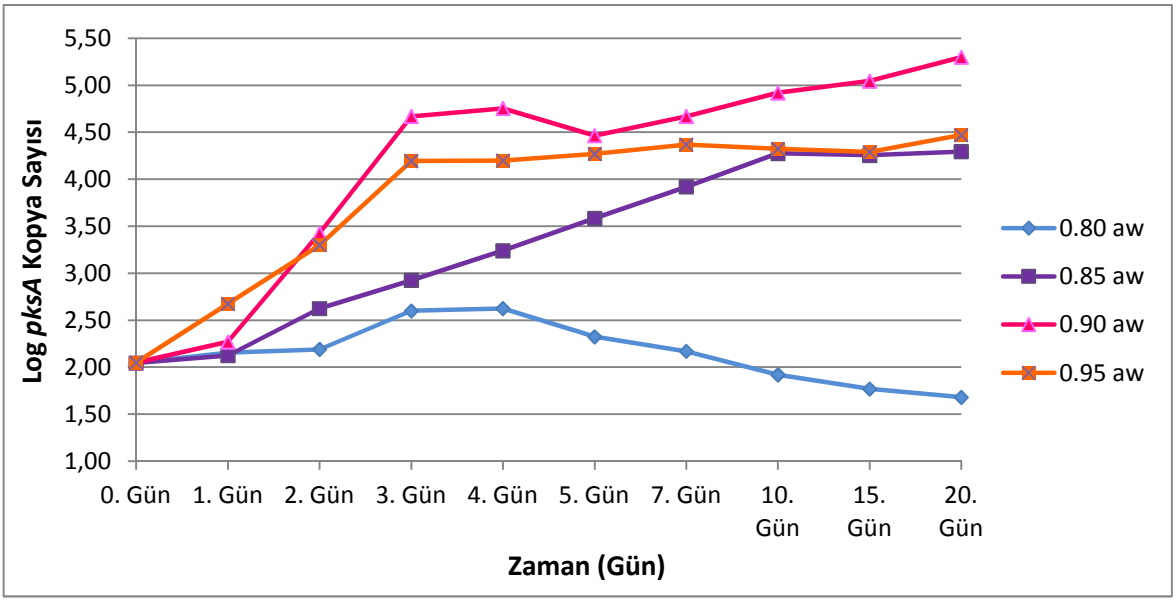
20 gün süreyle 5°C'de depolanan kontamine kırmızıbiber numunelerinin *aflR, nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının su aktivitesi ve zamana bağlı olarak değişimi, sırasıyla Şekil 3.53, 3.54 ve 3.55'te grafiklerle gösterilmiştir.



Şekil 3.53. 25°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde *AflR* Logaritmik Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

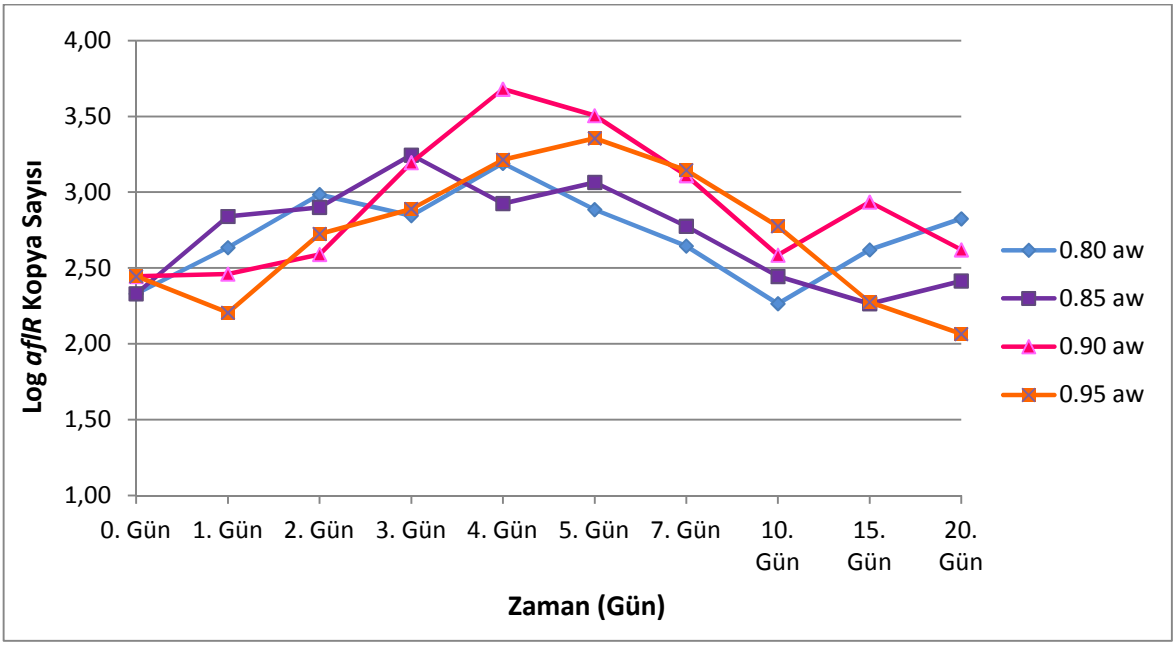


Şekil 3.54. 25°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde *Nor-1* Logaritmik Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

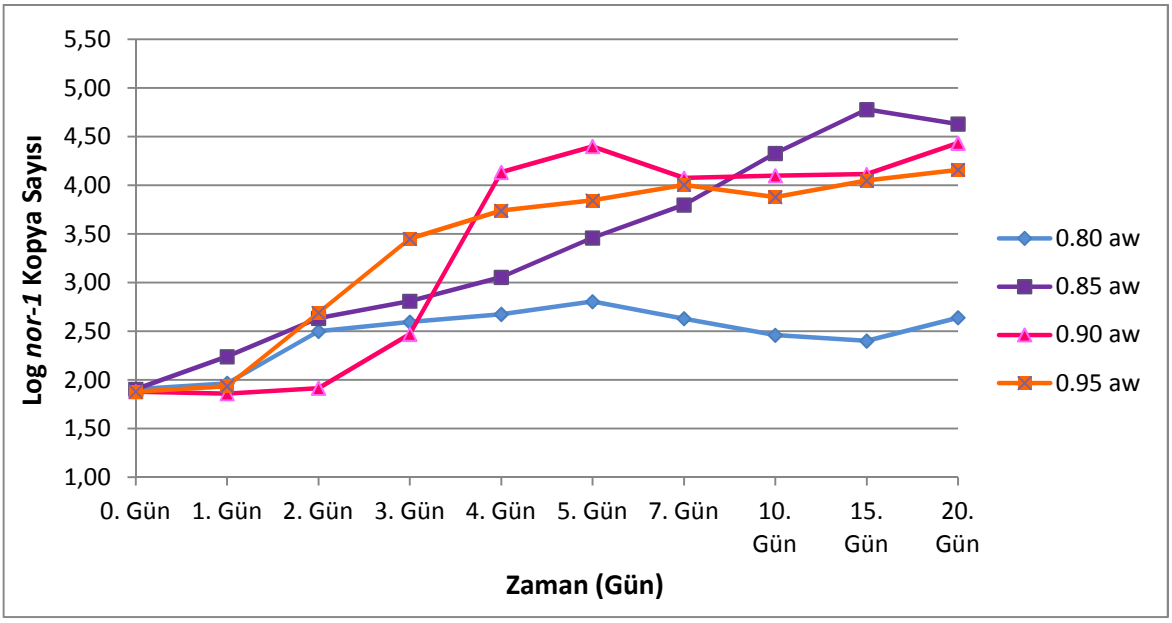


Şekil 3.55. 25°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde *PksA* Logaritmik Gen Kopya Sayılarının Zamana Bağlı Olarak Değişimi

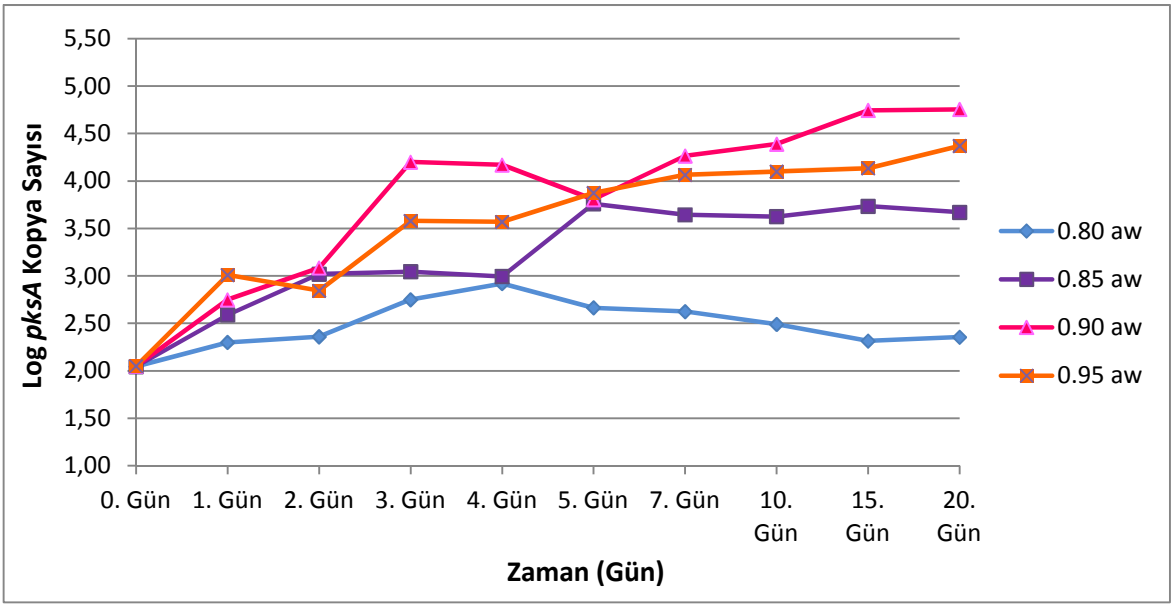
0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95 a_w değerlerinde 20 gün süreyle 5°C'de depolanan kontamine kırmızıbiber numunelerinin *aflR, nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının su aktivitesi ve zamana bağlı olarak değişimi, sırasıyla Şekil 3.56, 3.57 ve 3.58'de grafiklerle gösterilmiştir.



Şekil 3.56. 35°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde *AflR* Logaritmik Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi



Şekil 3.57. 35°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde *Nor-1* Logaritmik Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi



Şekil 3.58. 35°C'de Kontamine Kırmızıbiberlerde *PksA* Logaritmik Gen Kopya Sayılarının Su Aktivitesi ve Zamana Bağlı Olarak Değişimi

3.4. Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretiminin Modellenmesi

Çalışmada elde edilen verilerle, su aktivitesi (X_1), sıcaklık (X_2), zaman (X_3), *aflR* gen ekspresyonu (X_4), *nor-1* gen ekspresyonu (X_5) ve *pksA* gen ekspresyonu (X_6) faktörlerinin AFB_1 üretimi üzerine etkilerini ortaya koymak için matematiksel modeller oluşturulmuştur. Bu modellerin uygunluğu, varyansın modelde yer alan tahminleyiciler tarafından açıklanabilirliğinin bir ölçüsü olan düzeltilmiş determinasyon katsayısı ve artıkların normal olasılık dağlım grafiği ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, Minitab 17 istatistik paket programı yardımıyla YYM uygulanmıştır.

3.4.1. Su Aktivitesi 0.80 Olan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Sıcaklık, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model

Su aktivitesi 0.80 olan kontamine kırmızıbiberlerde AFB_1 üretimine, sıcaklık, zaman ve gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyonlarının etkilerini ifade eden YYM ile oluşturulan model aşağıda verilmiştir:

$$\begin{aligned} AFB_1\ (ppb) = & -4.35 - 0.060\ X_2 - 0.039\ X_3 - 0.09\ X_4 + 6.68\ X_5 + 3.04\ X_6 + \\ & 0.00092\ X_2^2 - 0.00356\ X_3^2 + 0.167\ X_4^2 + 1.022\ X_5^2 + 0.84\ X_6^2 - \\ & 0.00273\ X_2\ X_3 - 0.0738\ X_2\ X_4 + 0.1098\ X_2\ X_5 - 0.0054\ X_2\ X_6 + \\ & 0.0840\ X_3\ X_4 - 0.147\ X_3\ X_5 + 0.147\ X_3\ X_6 - \\ & 0.68\ X_4\ X_5 + 1.12\ X_4\ X_6 - 4.40\ X_5\ X_6 \end{aligned}$$

Bu modele göre 0.80 su aktivitesinde sıcaklık ve zamanla AFB_1 yanıtının değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği (A1), Şekil 3.59'da görülmektedir.

Ayrıca, regresyonda bu modelin uyum durumunun bir ölçüsü olan artıkların normal olasılık dağılımını gösteren grafik (B1), Şekil 3.60'da verilmiştir.

0.80 sabit su aktivitesinde, sıcaklık, zaman, *aflR* gen ekspresyonu, *nor-1* gen ekspresyonu ve *pksA* gen ekspresyonunun AFB_1 üretimi üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.12'de verilmiştir. Modelde yer alan tahminleyiciler, AFB_1 miktarında oluşan varyansı, %69.7 oranında açıklayabilmiştir. Tablo 3.12'de görüldüğü gibi, lineer modelde AFB_1 miktarı üzerine sıcaklık, zaman, *aflR* ve *pksA* gen ekspresyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunurken, sadece *nor-1* gen ekspresyonunun etkisinin çok önemli olduğu ($p<0.01$) tespit edilmiştir.

Tablo 3.12. 0.80 Sabit a_w'de AFB_1 Üretimi Üzerine Sıcaklık, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	20	3.86220	10.09	0.000
X_2 (Sıcaklık)	1	0.06281	0.16	0.687
X_3 (Zaman)	1	0.08715	0.23	0.635
X_4 (*AflR* Gen Ekspresyonu)	1	0.48439	1.26	0.265
X_5 (*Nor-1* Gen Ekspresyonu)	1	3.80037	9.92	0.003
X_6 (*PksA* Gen Ekspresyonu)	1	0.21287	0.56	0.459
X_2*X_2	1	0.24148	0.63	0.430
X_3*X_3	1	0.31532	0.82	0.368
X_4*X_4	1	0.02105	0.05	0.815
X_5*X_5	1	0.45998	1.20	0.278
X_6*X_6	1	0.16412	0.43	0.515
X_2*X_3	1	0.17117	0.45	0.506
X_2*X_4	1	0.64648	1.69	0.199
X_2*X_5	1	1.54732	4.04	0.049
X_2*X_6	1	0.00212	0.01	0.941
X_3*X_4	1	0.38768	1.01	0.318
X_3*X_5	1	0.56658	1.48	0.229
X_3*X_6	1	0.71407	1.86	0.177
X_4*X_5	1	0.13856	0.36	0.550
X_4*X_6	1	0.21706	0.57	0.455
X_5*X_6	1	1.81367	4.74	0.034
Hata	59	0.38296		
Toplam	79			
R^2	%77.37			
R^2_{adj}	%69.70			
R^2_{pred}	%51.92			

SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

3.4.2. Su Aktivitesi 0.85 Olan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Sıcaklık, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model

Su aktivitesi 0.85 olan kontamine kırmızıbiberlerde AFB_1 üretimine, sıcaklık, zaman ve gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyonlarının etkilerini ifade eden YYM ile oluşturulan model aşağıda verilmiştir:

$$
\begin{aligned}
AFB_1\ (ppb) = {} & 10.18 - 0.111\ X_2 - 0.208\ X_3 - 6.63\ X_4 + 7.73\ X_5 - 2.83\ X_6 + \\
& 0.00053\ X_2^2 + 0.0002\ X_3^2 + 1.1342\ X_4^2 - 2.757\ X_5^2 - 2.211\ X_6^2 + \\
& 0.01141\ X_2\ X_3 - 0.0134\ X_2\ X_4 + 0.0493\ X_2\ X_5 + 0.010\ X_2\ X_6 + \\
& 0.0276\ X_3\ X_4 - 0.166\ X_3\ X_5 - 0.085\ X_3\ X_6 - \\
& 1.40\ X_4\ X_5 + 0.81\ X_4\ X_6 + 4.77\ X_5\ X_6
\end{aligned}
$$

Bu modelde, 0.85 su aktivitesinde sıcaklık ve zamanla AFB_1 yanıtının değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği (A2), Şekil 3.59'da görülmektedir.

Ayrıca, modelin uygunluk durumunu gösteren artıkların normal olasılık dağılım grafiği (B2), Şekil 3.60'da görülmektedir.

0.85 sabit su aktivitesinde, sıcaklık, zaman, *aflR* gen ekspresyonu, *nor-1* gen ekspresyonu ve *pksA* gen ekspresyonunun AFB_1 üretimi üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.13'te verilmiştir. Modelde yer alan tahminleyiciler, AFB_1 miktarında oluşan varyansı, %82.59 oranında açıklayabilmiştir. Tablo 3.13'te görüldüğü gibi, lineer modelde AFB_1 miktarı üzerine sıcaklık ve *pksA* gen ekspresyonunun etkisi dışında diğer tüm değişkenlerin etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Kuadratik modelde ise, *nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının etkisinin istatistiksel olarak çok önemli olduğu ($p<0.01$) diğer faktörlerin karesel etkilerinin önemsiz olduğu ($p>0.05$) görülmüştür. Ayrıca, modelde sadece *nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının interaksiyon etkilerinin oldukça önemli olduğu ($p<0.01$) tespit edilmiştir.

Tablo 3.13. 0.85 Sabit a_w'de AFB_1 Üretimi Üzerine Sıcaklık, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	20	16.7309	19.74	0.000
X_2 (Sıcaklık)	1	21.5554	25.43	0.000
X_3 (Zaman)	1	0.2409	0.28	0.596
X_4 (*AflR* Gen Ekspresyonu)	1	2.1544	2.54	0.116
X_5 (*Nor-1* Gen Ekspresyonu)	1	1.2208	1.44	0.235
X_6 (*PksA* Gen Ekspresyonu)	1	7.2265	8.53	0.005
X_2*X_2	1	0.0813	0.10	0.758
X_3*X_3	1	0.0002	0.00	0.988
X_4*X_4	1	2.4160	2.85	0.097
X_5*X_5	1	6.9189	8.16	0.006
X_6*X_6	1	9.7767	11.54	0.001
X_2*X_3	1	3.0653	3.62	0.062
X_2*X_4	1	0.0685	0.08	0.777
X_2*X_5	1	0.4038	0.48	0.493
X_2*X_6	1	0.0202	0.02	0.878
X_3*X_4	1	3.3389	3.94	0.052
X_3*X_5	1	0.6628	0.78	0.380
X_3*X_6	1	0.3907	0.46	0.500
X_4*X_5	1	0.8121	0.96	0.332
X_4*X_6	1	0.3365	0.40	0.531
X_5*X_6	1	15.2139	17.95	0.000
Hata	59	0.8475		
Toplam	79			
R^2	%87.37			
R^2_{adj}	%82.59			
R^2_{pred}	%73.89			

SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

3.4.3. Su Aktivitesi 0.90 Olan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Sıcaklık, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model

Su aktivitesi 0.90 olan kontamine kırmızıbiberlerde AFB_1 üretimine, sıcaklık, zaman ve gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyonlarının etkilerini ifade eden YYM ile oluşturulan model aşağıda verilmiştir:

$$
\begin{aligned}
AFB_1\ (ppb) = {} & 28.64 - 0.175\ X_2 + 0.232\ X_3 - 12.29\ X_4 + 2.66\ X_5 - 2.83\ X_6 + \\
& 0.00121\ X_2^2 - 0.0425\ X_3^2 + 2.18\ X_4^2 + 0.364\ X_5^2 + 0.450\ X_6^2 + \\
& 0.0447\ X_2\ X_3 - 0.0008\ X_2\ X_4 + 0.0607\ X_2\ X_5 - 0.0107\ X_2\ X_6 + \\
& 0.247\ X_3\ X_4 - 0.2054\ X_3\ X_5 - 0.0081\ X_3\ X_6 + \\
& 1.11\ X_4\ X_5 + 0.286\ X_4\ X_6 - 0.265\ X_5\ X_6
\end{aligned}
$$

Bu model için, 0.90 a_w'de AFB_1 miktarına zaman ve sıcaklık faktörlerinin etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (A3) Şekil 3.59'da görülmektedir.

Modelin uygunluk durumunu gösteren artıkların normal olasılık dağılım grafiği (B3), Şekil 3.60'da verilmiştir.

0.90 sabit su aktivitesinde, sıcaklık, zaman, *aflR* gen ekspresyonu, *nor-1* gen ekspresyonu ve *pksA* gen ekspresyonunun AFB_1 üretimi üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.14'te verilmiştir. Modelde yer alan tahminleyiciler, AFB_1 miktarında oluşan varyansı, yaklaşık %93 oranında açıklayabilmiştir. Tablo 3.14'te görüldüğü gibi, lineer modelde AFB_1 miktarı üzerine sıcaklık ve zamanın etkisi istatistiksel olarak oldukça önemli ($p<0.01$) bulunurken *aflR*, *nor-1* ve *pksA* gen ekspresyonlarının etkisi önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Kuadratik modelde ise, sadece zamanın karesel etkisinin çok önemli olduğu, diğer faktörlerin karesel etkilerinin önemsiz olduğu ($p>0.05$) görülmüştür. Ayrıca, modelde sıcaklık-zaman ve zaman-*nor-1* gen ekspresyonu interaksiyonlarının oldukça önemli ($p<0.01$) olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3.14. 0.90 Sabit a_w'de AFB_1 Üretimi Üzerine Sıcaklık, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	20	118.944	56.80	0.000
X_2 (Sıcaklık)	1	123.510	58.98	0.000
X_3 (Zaman)	1	60.709	28.99	0.000
X_4 (*AflR* Gen Ekspresyonu)	1	1.726	0.82	0.368
X_5 (*Nor-1* Gen Ekspresyonu)	1	0.069	0.03	0.857
X_6 (*PksA* Gen Ekspresyonu)	1	0.577	0.28	0.602
X_2*X_2	1	0.436	0.21	0.650
X_3*X_3	1	36.054	17.22	0.000
X_4*X_4	1	7.344	3.51	0.066
X_5*X_5	1	1.502	0.72	0.400
X_6*X_6	1	1.927	0.92	0.341
X_2*X_3	1	40.763	19.46	0.000
X_2*X_4	1	0.000	0.00	0.991
X_2*X_5	1	3.612	1.72	0.194
X_2*X_6	1	0.093	0.04	0.834
X_3*X_4	1	5.906	2.82	0.098
X_3*X_5	1	11.625	5.55	0.022
X_3*X_6	1	0.026	0.01	0.911
X_4*X_5	1	3.291	1.57	0.215
X_4*X_6	1	0.228	0.11	0.743
X_5*X_6	1	0.500	0.24	0.627
Hata	59	2.094		
Toplam	79			
R^2	%95.06			
R^2_{adj}	%93.39			
R^2_{pred}	%90.16			

SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

3.4.4. Su Aktivitesi 0.95 Olan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Sıcaklık, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model

Su aktivitesi 0.95 olan kontamine kırmızıbiberlerde AFB_1 üretimine, sıcaklık, zaman ve gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyonlarının etkilerini ifade eden YYM ile oluşturulan model aşağıda verilmiştir:

$$
\begin{aligned}
AFB_1\ (ppb) = {} & 59.0 - 0.438\ X_2 + 4.25\ X_3 + 9.0\ X_4 - 4.7\ X_5 - 37.4\ X_6 - \\
& 0.00736\ X_2^2 - 0.1250\ X_3^2 + 4.44\ X_4^2 + 5.87\ X_5^2 + 5.62\ X_6^2 + \\
& 0.1848\ X_2\ X_3 + 0.414\ X_2\ X_4 + 0.018\ X_2\ X_5 + 0.148\ X_2\ X_6 + \\
& 0.996\ X_3\ X_4 - 1.143\ X_3\ X_5 - 0.632\ X_3\ X_6 - \\
& 6.81\ X_4\ X_5 + 7.46\ X_4\ X_6 - 4.03\ X_5\ X_6
\end{aligned}
$$

AFB_1 miktarına, zaman ve sıcaklık değişiminin etkisini üç boyutlu gösteren yanıt yüzey grafiği (A4), Şekil 3.59'da görülmektedir.

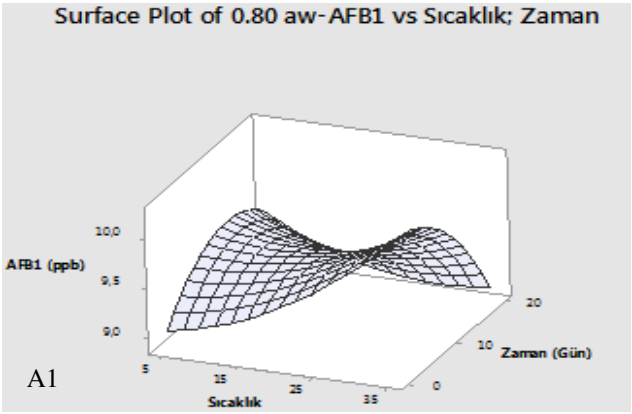
Bu model için yapılan uyum analizi sonucu elde edilen artıkların normal olasılık dağılım grafiği (B4), Şekil 3.60'da verilmiştir.

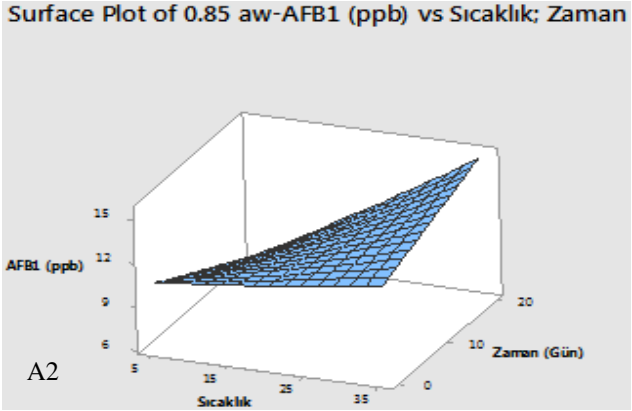
0.95 sabit su aktivitesinde, sıcaklık, zaman, *aflR* gen ekspresyonu, *nor-1* gen ekspresyonu ve *pksA* gen ekspresyonunun AFB_1 üretimi üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.15'te verilmiştir. Modelde yer alan tahminleyiciler, AFB_1 miktarında oluşan varyansı, yaklaşık %94 oranında açıklayabilmiştir. Tablo 3.15'te görüldüğü gibi, lineer modelde AFB_1 miktarı üzerine sıcaklık, zaman ve *nor-1* gen ekspresyonunun etkisi istatistiksel olarak oldukça önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. *AflR* ve *pksA* gen ekspresyonlarının modelde etkisi ise önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Bunun yanında, zaman ve *nor-1* gen ekspresyonunun kuadratik etkilerinin çok önemli ($p<0.01$) olduğu, diğer faktörlerin kuadratik etkilerinin ise önemsiz ($p>0.05$) olduğu görülmektedir. Ayrıca, oluşturulan modelde, sıcaklık-zaman, zaman-*aflR* gen ekspresyonu ve zaman-*nor-1* gen ekspresyonu interaksiyon etkileri dışında diğer ikili faktör interaksiyonlarının etkilerinin istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) olduğu anlaşılmıştır.

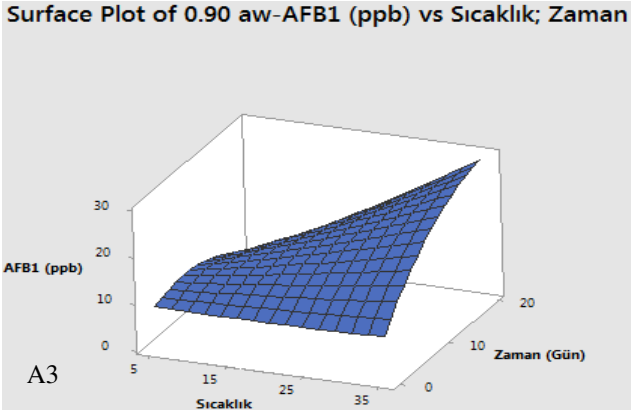
Tablo 3.15. 0.95 Sabit a_w'de AFB_1 Üretimi Üzerine Sıcaklık, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

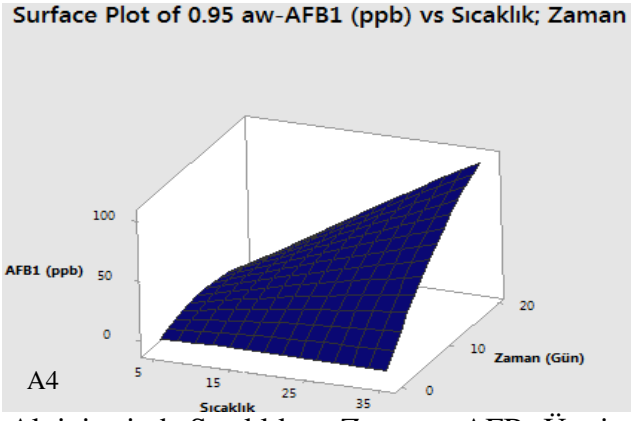
Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	20	1079.92	65.24	0.000
X_2 (Sıcaklık)	1	1168.91	70.62	0.000
X_3 (Zaman)	1	726.42	43.89	0.000
X_4 (*AflR* Gen Ekspresyonu)	1	32.52	1.96	0.166
X_5 (*Nor-1* Gen Ekspresyonu)	1	166.54	10.06	0.002
X_6 (*PksA* Gen Ekspresyonu)	1	18.54	1.12	0.294
X_2*X_2	1	15.95	0.96	0.330
X_3*X_3	1	287.34	17.36	0.000
X_4*X_4	1	13.92	30.84	0.363
X_5*X_5	1	58.63	3.54	0.065
X_6*X_6	1	40.81	2.47	0.122
X_2*X_3	1	374.22	22.61	0.000
X_2*X_4	1	38.31	2.31	0.134
X_2*X_5	1	0.10	0.01	0.938
X_2*X_6	1	9.68	0.58	0.448
X_3*X_4	1	77.01	4.65	0.035
X_3*X_5	1	96.82	5.85	0.019
X_3*X_6	1	21.45	1.30	0.260
X_4*X_5	1	23.01	1.39	0.243
X_4*X_6	1	18.08	1.09	0.300
X_5*X_6	1	12.33	0.74	0.392
Hata	59	16.55		
Toplam	79			
R^2	%95.67			
R^2_{adj}	%94.21			
R^2_{pred}	%90.56			

SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

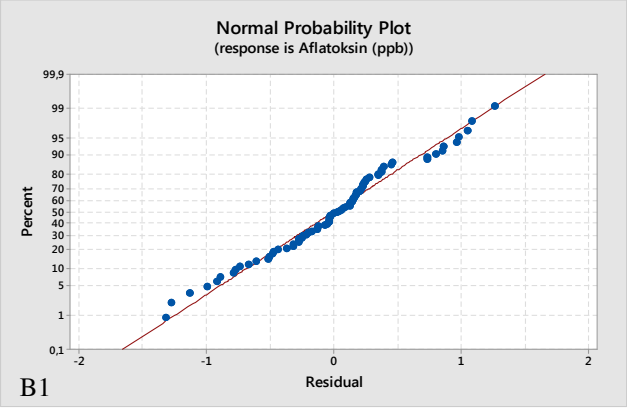


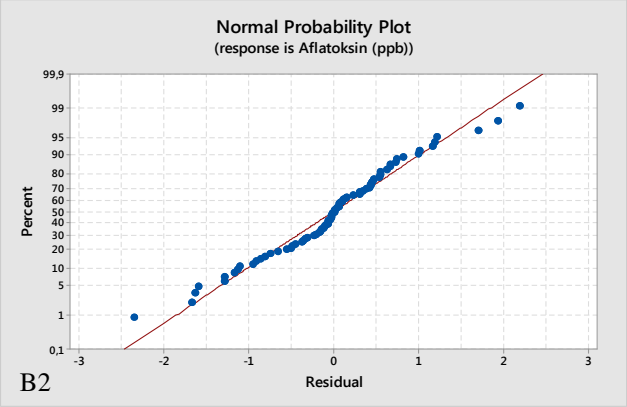


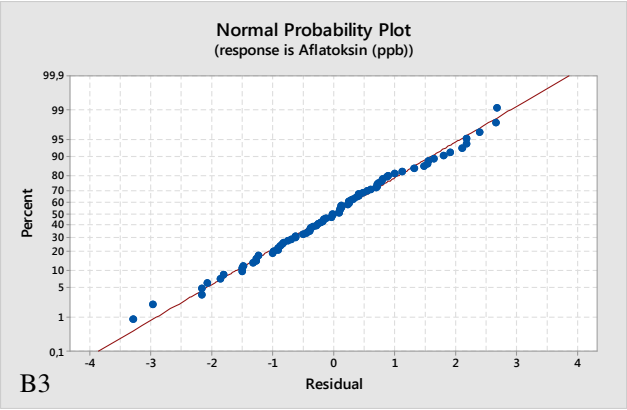


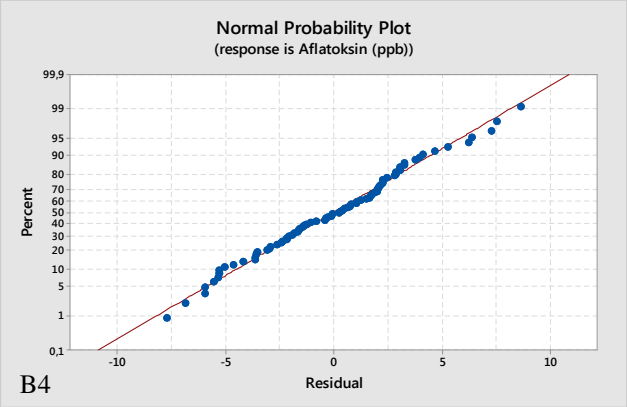


Şekil 3.59. Sabit Su Aktivitesinde Sıcaklık ve Zamanın AFB_1 Üretimi Üzerine Etkilerini Gösteren Yanıt Yüzey Grafikleri









Şekil 3.60. Sabit Su Aktivitesinde Oluşturulan Modeller İçin Artıkların Normal Olasılık Dağılım Grafikleri (B1, B2, B3, B4)

3.4.5. 5°C'de Depolanan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Su Aktivitesi, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model

5°C'de depolanan kontamine kırmızıbiberlerde AFB_1 üretimine, su aktivitesi, zaman ve gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyonlarının etkilerini ifade eden YYM ile oluşturulan model aşağıda verilmiştir:

$$
\begin{aligned}
AFB_1\ (ppb) = {} & 4.7 - 2.0\,X_1 - 0.562\,X_3 + 5.3\,X_4 - 4.52\,X_5 - 1.2\,X_6 - \\
& 2.7\,X_1^2 - 0.02362\,X_3^2 - 0.21\,X_4^2 + 0.695\,X_5^2 + 1.148\,X_6^2 + \\
& 1.593\,X_1\,X_3 - 4.2\,X_1\,X_4 + 9.28\,X_1\,X_5 + 0.6\,X_1\,X_6 + \\
& 0.022\,X_3\,X_4 - 0.092\,X_3\,X_5 - 0.079\,X_3\,X_6 - \\
& 0.89\,X_4\,X_5 + 0.47\,X_4\,X_6 - 1.66\,X_5\,X_6
\end{aligned}
$$

AFB_1 miktarına, sabit 5°C'de su aktivitesi ve zamanın etkisini üç boyutlu gösteren yanıt yüzey grafiği (C1), Şekil 3.61'de görülmektedir.

Bu modelin uygunluğunun iyilik durumunu gösteren artıkların normal olasılık dağılım grafiği (D1), Şekil 3.62'de verilmiştir.

5°C sabit depolama sıcaklığında, su aktivitesi, zaman, *aflR* gen ekspresyonu, *nor-1* gen ekspresyonu ve *pksA* gen ekspresyonunun AFB_1 üretimi üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.16'da verilmiştir. Modelde yer alan tahminleyiciler, AFB_1 miktarında oluşan varyansı, %75.63 oranında açıklayabilmiştir. Tablo 3.16'da görüldüğü gibi, modelde AFB_1 miktarı üzerine sadece su aktivitesinin lineer etkisi istatistiksel olarak oldukça önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Aynı zamanda, zamanın karesel etkisinin ve su aktivitesi-zaman interaksiyon etkisinin önemli ($p<0.05$) olduğu görülmüştür.

Tablo 3.16. 5°C'de AFB_1 Üretimi Üzerine Su Aktivitesi, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	20	14.6901	13.26	0.000
X_1 (Su Aktivitesi)	1	11.3653	10.26	0.002
X_3 (Zaman)	1	0.4508	0.41	0.526
X_4 (*AflR* Gen Ekspresyonu)	1	0.3712	0.33	0.565
X_5 (*Nor-1* Gen Ekspresyonu)	1	0.0834	0.08	0.785
X_6 (*PksA* Gen Ekspresyonu)	1	1.3883	1.25	0.268
X_1*X_1	1	0.0013	0.00	0.973
X_3*X_3	1	6.9342	6.26	0.015
X_4*X_4	1	0.0466	0.04	0.838
X_5*X_5	1	1.6844	1.52	0.223
X_6*X_6	1	2.0513	1.85	0.179
X_1*X_3	1	4.6654	4.21	0.045
X_1*X_4	1	0.1157	0.10	0.748
X_1*X_5	1	1.0257	0.93	0.340
X_1*X_6	1	0.0027	0.00	0.961
X_3*X_4	1	0.0349	0.03	0.860
X_3*X_5	1	0.6399	0.58	0.450
X_3*X_6	1	0.3559	0.32	0.573
X_4*X_5	1	0.3577	0.32	0.572
X_4*X_6	1	0.1589	0.14	0.706
X_5*X_6	1	1.8433	1.66	0.202
Hata	59			
Toplam	79			
R^2	%81.80			
R^2_{adj}	%75.63			
R^2_{pred}	%64.37			

SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

3.4.6. 15°C'de Depolanan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Su Aktivitesi, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model

15°C'de depolanan kontamine kırmızıbiberlerde AFB_1 üretimine, su aktivitesi, zaman ve gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyonlarının etkilerini ifade eden YYM ile oluşturulan model aşağıda verilmiştir:

$$\begin{aligned} AFB_1\ (ppb) = {} & 124.0 - 299.0\ X_1 - 4.81\ X_3 + 22.3\ X_4 + 10.4\ X_5 - 28.6\ X_6 + \\ & 206\ X_1^2 - 0.0283\ X_3^2 + 3.84\ X_4^2 + 1.381\ X_5^2 + 1.876\ X_6^2 + \\ & 7.14\ X_1\ X_3 - 45.4\ X_1\ X_4 - 11.6\ X_1\ X_5 + 41.5\ X_1\ X_6 + \\ & 0.402\ X_3\ X_4 - 0.464\ X_3\ X_5 - 0.199\ X_3\ X_6 - \\ & 2.92\ X_4\ X_5 + 0.67\ X_4\ X_6 + 0.70\ X_5\ X_6 \end{aligned}$$

15°C'de su aktivitesi ve zamanın AFB_1 miktarına etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (C2), Şekil 3.61'de görülmektedir.

Bu modelin uygunluk durumunu ifade eden artıkların normal olasılık dağılım grafiği (D2), Şekil 3.62'de verilmiştir.

15°C sabit depolama sıcaklığında, su aktivitesi, zaman, *aflR* gen ekspresyonu, *nor-1* gen ekspresyonu ve *pksA* gen ekspresyonunun AFB_1 üretimi üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.17'de verilmiştir. Modelde yer alan tahminleyiciler, AFB_1 miktarında oluşan varyansı, %85.23 oranında açıklayabilmiştir. Tablo 3.17'de görüldüğü gibi, AFB_1 miktarı üzerine lineer modelde su aktivitesinin etkisi istatistiksel olarak oldukça önemli ($p<0.01$), *pksA* gen ekspresyonunun etkisi önemli ($p<0.05$), diğer faktörlerin etkisi önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Karesel modelde ise, zamanın etkisi $p<0.01$ düzeyinde, *aflR* ve *pksA* gen ekspresyonunun etkisi $p<0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Ayrıca, su aktivitesi-zaman ve su aktivitesi-*aflR* gen ekspresyonu interaksiyonlarının çok önemli ($p<0.01$), su aktivitesi-*pksA* gen ekspresyonu, zaman-*aflR* gen ekspresyonu ve zaman-*nor-1* gen ekspresyonu interaksiyonlarının ise önemli ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3.17. 15°C'de AFB_1 Üretimi Üzerine Su Aktivitesi, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	20	64.661	23.80	0.000
X_1 (Su Aktivitesi)	1	163.345	60.11	0.000
X_3 (Zaman)	1	2.799	1.03	0.314
X_4 (*AflR* Gen Ekspresyonu)	1	0.094	0.03	0.853
X_5 (*Nor-1* Gen Ekspresyonu)	1	5.349	1.97	0.166
X_6 (*PksA* Gen Ekspresyonu)	1	13.647	5.02	0.029
X_1*X_1	1	7.470	2.75	0.103
X_3*X_3	1	20.497	7.54	0.008
X_4*X_4	1	12.969	4.77	0.033
X_5*X_5	1	6.489	2.39	0.128
X_6*X_6	1	12.211	4.49	0.038
X_1*X_3	1	25.339	9.32	0.003
X_1*X_4	1	23.961	8.82	0.004
X_1*X_5	1	1.028	0.38	0.541
X_1*X_6	1	12.651	4.66	0.035
X_3*X_4	1	10.841	3.99	0.050
X_3*X_5	1	16.402	6.04	0.017
X_3*X_6	1	9.328	3.43	0.069
X_4*X_5	1	9.215	3.39	0.071
X_4*X_6	1	0.700	0.26	0.614
X_5*X_6	1	0.453	0.17	0.684
Hata	59			
Toplam	79			
R^2	%88.97			
R^2_{adj}	%85.23			
R^2_{pred}	%72.95			

SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

3.4.7. 25°C'de Depolanan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Su Aktivitesi, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model

25°C'de depolanan kontamine kırmızıbiberlerde AFB_1 üretimine, su aktivitesi, zaman ve gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyonlarının etkilerini ifade eden YYM ile oluşturulan model aşağıda verilmiştir:

$$
\begin{aligned}
AFB_1\ (ppb) = {} & 200.0 - 413.0\,X_1 - 22.08\,X_3 - 14.6\,X_4 - 37.0\,X_5 + 42.2\,X_6 + \\
& 247.0\,X_1^2 - 0.0534\,X_3^2 + 4.79\,X_4^2 - 1.20\,X_5^2 + 1.05\,X_6^2 + \\
& 28.73\,X_1 X_3 - 11.9\,X_1 X_4 - 51.7\,X_1 X_5 - 44.0\,X_1 X_6 + \\
& 0.273\,X_3 X_4 + 0.535\,X_3 X_5 - 0.996\,X_3 X_6 - \\
& 0.44\,X_4 X_5 - 2.05\,X_4 X_6 - 0.99\,X_5 X_6
\end{aligned}
$$

Şekil 3.61'de, 25°C sabit sıcaklıkta depolanan kontamine kırmızıbiberlerde AFB_1 üretiminin su aktivitesi ve zamanla değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği (C3) görülmektedir.

Yukardaki modelin uygunluğu için yapılan artıkların analizi sonucunda elde edilen artıkların normal olasılık dağılım grafiği (D3) ise, Şekil 3.62'de verilmiştir.

25°C sabit depolama sıcaklığında, su aktivitesi, zaman, *aflR* gen ekspresyonu, *nor-1* gen ekspresyonu ve *pksA* gen ekspresyonunun AFB_1 üretimi üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.18'de verilmiştir. Modelde yer alan tahminleyiciler, AFB_1 miktarında oluşan varyansı, yaklaşık %94.68 oranında açıklayabilmiştir. Tablo 3.18'de görüldüğü gibi, AFB_1 miktarı üzerine lineer modelde su aktivitesi, zaman ve *pksA* gen ekspresyonunun etkisi oldukça önemli ($p<0.01$), *nor-1* gen ekspresyonunun etkisi önemli ($p<0.05$), *aflR* gen ekspresyonunun etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Kuadratik modelde ise, sadece zamanın etkisinin önemli ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, modelde su aktivitesi-zaman, zaman-*pksA* gen ekspresyonu interaksiyonlarının çok önemli ($p<0.01$), su aktivitesi-*nor-1* gen ekspresyonu interaksiyonunun ise önemli ($p<0.05$) olduğu görülmüştür.

Tablo 3.18. 25°C'de AFB_1 Üretimi Üzerine Su Aktivitesi, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	20	575.25	71.34	0.000
X_1 (Su Aktivitesi)	1	2902.32	359.93	0.000
X_3 (Zaman)	1	1185.15	146.98	0.000
X_4 (*AflR* Gen Ekspresyonu)	1	6.31	0.78	0.380
X_5 (*Nor-1* Gen Ekspresyonu)	1	34.42	4.27	0.043
X_6 (*PksA* Gen Ekspresyonu)	1	261.41	32.42	0.000
X_1*X_1	1	9.18	1.14	0.290
X_3*X_3	1	105.23	13.05	0.001
X_4*X_4	1	23.69	2.94	0.092
X_5*X_5	1	5.70	0.71	0.404
X_6*X_6	1	6.63	0.82	0.368
X_1*X_3	1	861.53	106.84	0.000
X_1*X_4	1	1.01	0.12	0.725
X_1*X_5	1	33.01	4.09	0.048
X_1*X_6	1	15.84	1.96	0.166
X_3*X_4	1	9.23	1.15	0.289
X_3*X_5	1	27.96	3.47	0.068
X_3*X_6	1	134.96	16.74	0.000
X_4*X_5	1	0.39	0.05	0.827
X_4*X_6	1	8.17	1.01	0.318
X_5*X_6	1	3.04	0.38	0.542
Hata	59	8.06		
Toplam	79			
R^2	%96.03			
R^2_{adj}	%94.68			
R^2_{pred}	%89.70			

SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

3.4.8. 35°C'de Depolanan Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi İle Su Aktivitesi, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model

35°C'de depolanan kontamine kırmızıbiberlerde AFB_1 üretimine, su aktivitesi, zaman ve gen (*aflR, nor-1* ve *pksA*) ekspresyonlarının etkilerini ifade eden YYM ile oluşturulan model aşağıda verilmiştir:

$$
\begin{aligned}
AFB_1\ (ppb) = {} & 330.0 - 600.0\,X_1 - 20.75\,X_3 - 14.8\,X_4 - 44.7\,X_5 + 7.9\,X_6 + \\
& 270.0\,X_1^2 - 0.1055\,X_3^2 + 3.02\,X_4^2 - 1.85\,X_5^2 - 0.93\,X_6^2 + \\
& 27.92\,X_1\,X_3 + 8.2\,X_1\,X_4 + 55.5\,X_1\,X_5 - 8.2\,X_1\,X_6 + \\
& 0.836\,X_3\,X_4 + 0.296\,X_3\,X_5 - 1.030\,X_3\,X_6 + \\
& 2.62\,X_4\,X_5 - 1.32\,X_4\,X_6 + 3.72\,X_5\,X_6
\end{aligned}
$$

Şekil 3.61'de, bu modele göre AFB_1 üretimine 35°C'de su aktivitesi ve zamanın etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (C4) görülmektedir.

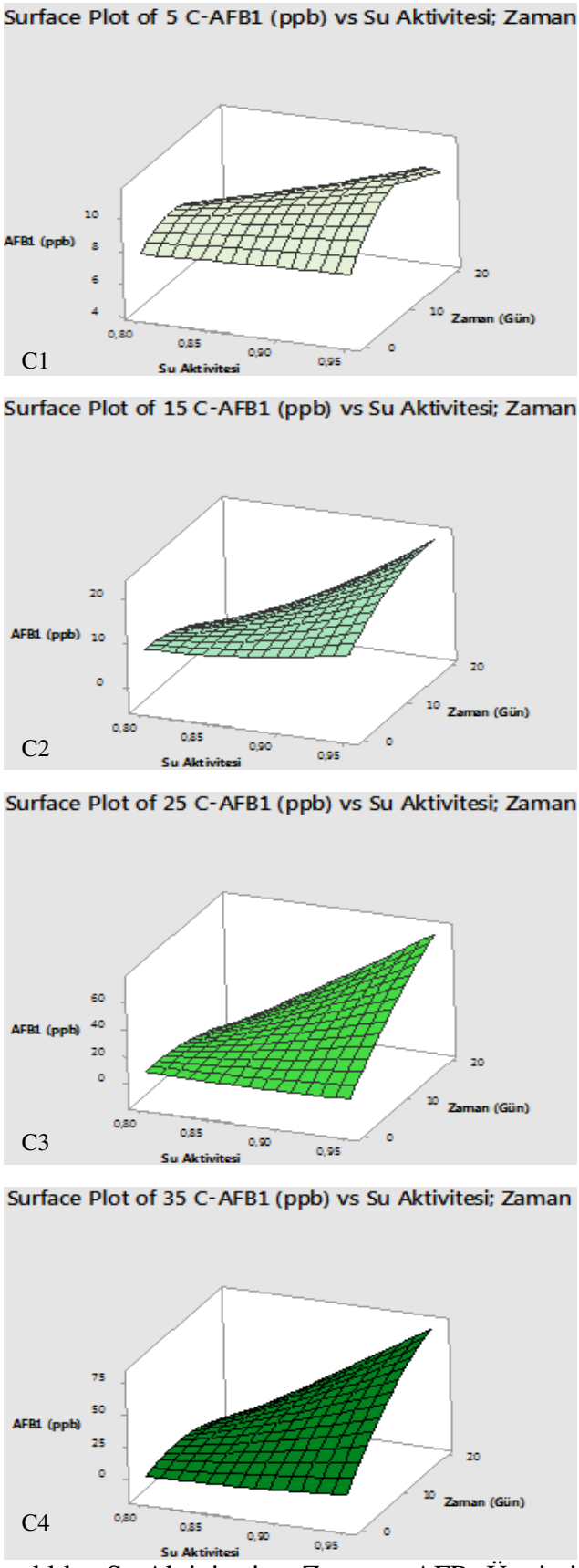
Şekil 3.62'de ise, artıkların normal olasılık dağılım grafiği (D4) verilmiştir.

35°C sabit depolama sıcaklığında, su aktivitesi, zaman, *aflR* gen ekspresyonu, *nor-1* gen ekspresyonu ve *pksA* gen ekspresyonunun AFB_1 üretimi üzerine etkilerine ait varyans analizi Tablo 3.19'da verilmiştir. Modelde yer alan tahminleyiciler, AFB_1 miktarında oluşan varyansı, yaklaşık %92 oranında açıklayabilmiştir. Tablo 3.19'da görüldüğü gibi, AFB_1 miktarı üzerine lineer modelde faktörlerin etkisi aynı önem düzeyinde bulunmuştur. Yani, kırmızıbiberde aflatoksijenik *A. flavus*'un AFB_1 üretimine su aktivitesi, zaman ve *pksA* gen ekspresyonunun etkisi oldukça önemli ($p<0.01$), *nor-1* gen ekspresyonunun etkisi önemli ($p<0.05$), *aflR* gen ekspresyonunun etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Kuadratik modelde ise, sadece zamanın etkisinin önemli ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, modelde su aktivitesi-zaman interaksiyon etkisinin $p<0.01$ düzeyinde çok önemli, zaman-*pksA* gen ekspresyonu interaksiyon etkisinin $p<0.05$ düzeyinde önemli olduğu ortaya konmuştur.

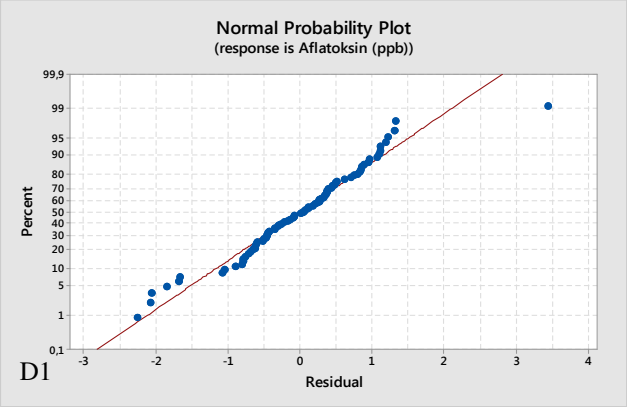
Tablo 3.19. 35°C'de AFB_1 Üretimi Üzerine Su Aktivitesi, Zaman ve Gen (*AflR, Nor-1, PksA*) Ekspresyonunun Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

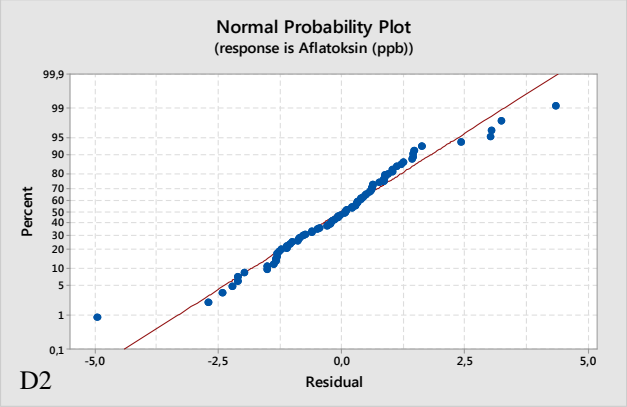
Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO_D**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	20	823.52	47.00	0.000
X_1 (Su Aktivitesi)	1	2377.17	135.67	0.000
X_3 (Zaman)	1	539.45	30.79	0.000
X_4 (*AflR* Gen Ekspresyonu)	1	58.86	3.36	0.072
X_5 (*Nor-1* Gen Ekspresyonu)	1	0.15	0.01	0.927
X_6 (*PksA* Gen Ekspresyonu)	1	222.48	12.70	0.001
X_1*X_1	1	11.61	0.66	0.419
X_3*X_3	1	199.44	11.38	0.001
X_4*X_4	1	11.44	0.65	0.422
X_5*X_5	1	14.34	0.82	0.369
X_6*X_6	1	2.42	0.14	0.711
X_1*X_3	1	352.53	20.12	0.000
X_1*X_4	1	0.52	0.03	0.864
X_1*X_5	1	22.94	1.31	0.257
X_1*X_6	1	0.57	0.03	0.857
X_3*X_4	1	50.83	2.90	0.094
X_3*X_5	1	7.74	0.44	0.509
X_3*X_6	1	101.06	5.77	0.019
X_4*X_5	1	11.90	0.68	0.413
X_4*X_6	1	2.37	0.14	0.714
X_5*X_6	1	25.61	1.46	0.232
Hata	59	17.52		
Toplam	79			
R^2	%94.09			
R^2_{adj}	%92.09			
R^2_{pred}	%88.61			

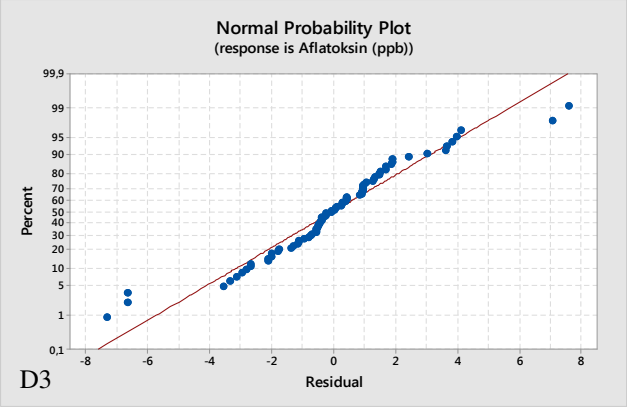
SD: Serbestlik Derecesi; KO_D: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması;
F-Değeri: F Testi Değeri; P-Değeri: İstatistiksel Önem Değeri; R^2: Determinasyon Katsayısı;
R^2_{adj}: Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı; R^2_{pred}: Tahminleyici Determinasyon Katsayısı

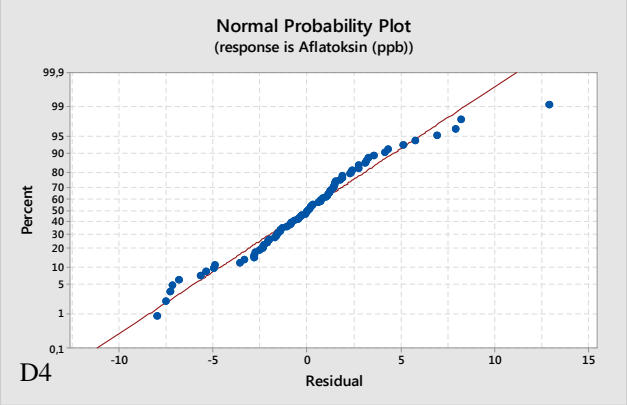


Şekil 3.61. Sabit Sıcaklıkta Su Aktivitesi ve Zamanın AFB_1 Üretimi Üzerine Etkilerini Gösteren Yanıt Yüzey Grafikleri









Şekil 3.62. Sabit Sıcaklıkta Oluşturulan Modeller İçin Artıkların Normal Olasılık Dağılım Grafikleri

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma sonucunda elde edilen bulgular, 3. Bölüm'de detaylı olarak verilmiştir. Bu bölümde, mevcut bulgular değerlendirilmiş ve bu proje kapsamına benzer konularda daha önce yapılan araştırma sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, çalışma bulguları ışığında ulaşılan sonuçlar özetlenmiş ve bu alanda yapılacak yeni çalışmalar için öneriler getirilmiştir.

4.1. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki Küf Sayım Sonuçları

Kırmızıbiberlerin %2 düzeyinde 10^6 spor/mL konsantrasyonunda fungal spor süspansiyonu ile kontaminasyonunun hemen sonrasında yapılan kültürel ekim sonuçları, numunelerde AFPA ve DRBC besiyerine göre, ortalama sırasıyla $1.4x10^5$-$1.6x10^5$ kob/g (5.13-5.19 log kob/g) ve $1.6x10^5$-$1.9x10^5$ kob/g (5.20-5.27 log kob/g) arasında *A. flavus* olduğunu göstermiştir.

0.80 a_w'de depolanan tüm kırmızıbiber numunelerinde en yüksek *A. flavus* sayıları, inkübasyonun ilk günlerinde tespit edilmiş olup daha sonraki günlerde küf sayısı azalmış ve depolamanın son gününde AFPA besiyerinde 5°C'deki numunelerde 4.38 log kob/g, 25°C ve 35°C'deki numunelerde ise sırasıyla 2.68 ve 2.93 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Depolama süresince, özellikle 25°C ve 35°C'deki kırmızıbiberlerin *A. flavus* sayısında dikkat çekici bir azalma gözlenmiştir. Depolamanın son günündeki küf sayıları esas alındığında, 25°C ve 35°C'deki bu azalmanın, 5°C'deki kırmızıbiberlere kıyasla yaklaşık 2 log birim daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durumun, kırmızıbiberlerde bulunan antifungal etkili bileşenlerin aktivitesinin 25°C ve üzerindeki sıcaklıklarda artmasından kaynaklandığı ve küf gelişimi için optimum a_w seviyesinden uzaklaştıkça bu antifungal bileşiklere karşı küflerin direnç gösteremediği tahmin edilmektedir.

0.85 a_w'de depolanan tüm numuneler için maksimum küf sayıları 2. ya da 3. günlerde kaydedilmiş ve bu günlerden itibaren inkübasyon periyodunun sonuna kadar düşme eğilimi göstermiştir. Depolamanın son gününde, en yüksek küf sayısı 5°C'de, en düşük küf sayısı ise 15°C'de depolanan kırmızıbiberlerde tespit edilmiştir. Ancak, bu a_w değeri için, ortalama küf sayılarının sıcaklıkla değişimi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

0.80 ve 0.85 a_w değerleri, *A. flavus*'un minimum su aktivitesi gereksiniminin (0.71-0.74) [Kozakiewicz ve Smith, 1994] üzerinde olduğu halde, kırmızıbiberlerin küf sayılarının test edilen tüm sıcaklık dereceleri için depolama süresince düşmesinin, kırmızıbiberlerdeki antifungal etkili bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

0.90 a_w'de depolanan kırmızıbiberlerdeki küf sayılarının, depolama süresince 5°C ve 15°C'lerde düştüğü, 25°C ve 35°C'lerde ise yükseldiği gözlenmiştir. Depolama boyunca, her iki besiyerinde tespit edilen ortalama küf sayılarına göre, 25°C ve 35°C'lere ait değerlerin, 5°C ve 15°C'lere ait değerlerden istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Depolamanın son gününde ise, en yüksek ve en düşük küf sayısına sahip numuneler arasındaki farkın, 3.39 log kob/g'a kadar yükseldiği gözlenmiştir.

0.95 a_w'de olan kırmızıbiberlerin 20 gün boyunca küf sayıları incelendiğinde, 5°C'de depolananlarda azalma, 25°C ve 35°C'lerde depolananlarda ise yaklaşık 2 log kob/g'lık artma görülmüştür. 0.95 a_w'de 15°C'deki numunelerde depolama süresince belirgin bir değişiklik tespit edilmemekle birlikte, bu sıcaklıktaki numunelerin ortalama küf sayılarının, 5°C'deki numunelerden istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p>0.05$), 25°C ve 35°C'lerdeki numunelerden ise önemli derecede ($p<0.05$) düşük olduğu bulunmuştur. 0.95 a_w-35°C'de depolanan kırmızıbiberlerin küf sayıları, her iki besi ortamında 15. günde maksimum değere çıkmıştır. AFPA besiyerlerindeki 15. gün küf sayıları 7.40 log kob/g ve DRBC besiyerinde ise, 7.17 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Her iki koşul için, 20. gün belirlenen küf sayılarının, 15. gün belirlenen küf sayılarından daha düşük olması, kırmızıbiberlerdeki *A. flavus* popülasyonunun 15. günden sonra azalmaya devam edeceğini düşündürmüştür.

5°C'de depolanan tüm kırmızıbiber numunelerinin küf sayıları incelendiğinde, depolama süresince farklı su aktivitesi değerlerinde tespit edilen ortalama küf sayılarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür. 15°C'de depolanan kırmızıbiberlerde ise, yalnızca a_w değeri 0.95 olan numunelerin ortalama küf sayılarının, diğer a_w değerlerindeki numunelerden önemli derecede ($p<0.05$) yüksek olduğu tespit edilmiştir.

25°C'de depolanan kırmızıbiberlerde AFPA besiyerindeki küf sayıları, başlangıç 5.19 log kob/g değerinden 0.90 a_w'de 20 gün sonunda 6.89 log kob/g'a, 0.95 a_w'de 20 gün boyunca 7.18 log kob/g'a yükselmiştir. Aynı sıcaklıkta depolanan kırmızıbiberlerin DRBC besiyerine yapılan ekimlerinde de benzer bir artış olmuştur. DRBC'de 25°C'de başlangıç küf sayıları, 5.27 log kob/g olan kırmızıbiberler, 0.90 a_w'de 20 gün sonunda 7.01 log kob/g'a, 0.95 a_w'de 20 gün sonunda ise 7.23 log kob/g'a yükselmiştir. Bu artışlar, 0.90 a_w-25°C ve 0.95 a_w-25°C koşullarının kırmızıbiberlerde *A. flavus*'un gelişimi için uygun olduğunu teyit etmekle birlikte, *A. flavus*'un kırmızıbiber kaynaklı antifungal bileşiklere karşı bu koşullarda direnç göstererek üremeye devam ettiğini ortaya koymuştur.

Hem 25°C hem de 35°C'de depolanan kırmızıbiberler için en dikkat çekici tespit, 0.90 ile 0.95 a_w'ye sahip numunelerin küf sayılarının 0.80 ile 0.85 a_w'ye sahip numunelerin küf sayılarından istatistiksel olarak önemli derecede yüksek ($p<0.05$) olduğudur. Öyle ki, 25°C'de depolanan örnekler için depolamanın son gününde, a_w değerleri 0.80 ile 0.95 olan numunelerin küf sayıları arasındaki farkın yaklaşık 5 log birime kadar yükseldiği gözlenmiştir.

YES besiyerinde, NRRL 3357 *A. flavus* suşunun gelişimini 9 gün boyunca her gün koloni çapını ölçerek izleyen araştırmacılar [Abdel-Hadi ve ark., 2012], test edilen suşun 25-40°C arasında ve 0.95 a_w'de iyi geliştiğini, 30-35°C arasında ve 0.99 a_w'de ise optimum gelişme gösterdiğini tespit etmişlerdir. Çalışma sonunda, *A. flavus* küf gelişimi için marjinal a_w ve sıcaklık koşullarının 0.90 a_w'nin altı ve 20°C'nin altı ile 35°C'nin üstü olduğu ifade edilmiştir. Bu sonuçlar, kırmızıbiberler için elde edilen bulgularla uyumludur.

Rodriguez ve ark. (2012b), 3 log spor/g düzeyinde *A. flavus* inoküle edilen 0.84 ve 0.92 a_w değerindeki kürlenmiş jambonları, 25°C'de 21 gün inkübe etmişler ve 0, 7, 14 ve 21. günlerde küf sayımı yapmışlardır. Sonuçta, 0.92 a_w değerinde olan numunelerin küf sayılarının 0.84 a_w'ye göre inkübasyon boyunca daha hızlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. 0.92 a_w değerindeki kürlenmiş jambonların başlangıçta 2.8 log kob/g olan *A. flavus* sayıları, 7. günde, 4.8, 14. günde 6.1 ve 21. günde 7.4 log kob/g'a ulaşmıştır. Bu sonuç, 20 gün süresince 25°C'de depolanan ve a_w değeri 0.90 ve 0.95 olan kırmızıbiberlerin küf sayısındaki artış ile uyumludur. Ancak, kürlenmiş jambonlarda 0.84 a_w'deki küf sayılarının depolama boyunca gösterdiği değişim profilinin aksine, 25°C'de 0.85 a_w'ye ayarlı kırmızıbiberlerin küf sayılarının düşüş seyrinde olması, kırmızıbiberlerdeki antifungal bileşenlerin etkisini desteklemektedir.

Abdel-Hadi ve ark. (2010), 0.85, 0.90 ve 0.95 a_w değerlerine ayarlayıp *A. flavus* ile kontamine ettikleri yer fıstıklarında, 25°C'de 6 haftalık depolama süresince en yüksek küf sayısını 0.95 a_w'de depolanan numunelerde tespit etmişlerdir. 0.90 ve 0.95 a_w'deki yer fıstıklarının küf sayılarının depolama boyunca artan bir seyir izlemesi, bu çalışmada 25°C'de depolanan aynı a_w değerlerindeki kırmızıbiberlerin küf gelişimine benzemektedir. Ancak, 0.85 a_w'ye ayarlı yer fıstıklarının küf sayısı 3. haftaya kadar artıp 4. hafta düşmüş ve sonra 5. ve 6. haftalar tekrar yükselmiştir. Oysa, 25°C'de 0.85 a_w'deki kırmızıbiberlerin *A. flavus* sayıları depolamanın 3. gününden itibaren sürekli düşüş göstermiştir. Bu durum, farklı ortamlarda *A. flavus* suşlarının substrat bileşiminden etkilenerek farklı bir gelişim gösterebileceğini ortaya koymuştur. Bunun yanında, çalışma sonunda, kırmızıbiberlerde olduğu gibi, yer fıstıklarında da su aktivitesinin, zamanın ve bu faktörlerin interaksiyonlarının küf sayısı üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ifade edilmiştir.

Marín ve ark. (2009), aflatoksijenik *A. flavus* izolatlarının, %3 oranında kırmızıbiber ekstraktı içeren ve a_w değerleri farklı (0.99, 0.97, 0.95, 0.93, 0.91, 0.89, 0.87 ve 0.85) besiyerlerindeki gelişimini, 25°C'de 90 gün boyunca koloni çapı ölçümü yaparak izlemişlerdir. Sonuçta, kırmızıbiber ekstraktlı agarlarda farklı aflatoksijenik izolatlar için test edilen a_w değerlerinden, *A. flavus* gelişimi için optimum aralık 0.97-0.99, minumum aralık ise 0.82-0.88 olarak tespit edilmiştir.

A. flavus'un YES besiyerinde 7 gün boyunca gelişme oranının (küf koloni çapının) su aktivitesi ve sıcaklıkla değişimini belirlemek için yürütülen çalışmada [Schmidt-Heydt ve ark., 2009], a_w arttıkça küf gelişiminin arttığı ve en yüksek küf gelişiminin 0.99 a_w-35°C'de olduğu ortaya konmuştur. Giorni ve ark. (2008) ise, PDA petrilerine ve mısır tanelerine inokule edilen aflatoksijenik *A. flavus*'un 0.95 a_w'de 0.92 a_w'den daha iyi geliştiğini göstermiştir.

4.2. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki AFB_1 Miktarları

Bu çalışmada, kırmızıbiberlerin 10^6 spor/mL konsantrasyonunda fungal spor süspansiyonu ile kontamine edilmesinden hemen sonra yapılan aflatoksin analizleri sonucunda, numunelerde ortalama 7.60-7.92 ppb seviyesinde AFB_1 tespit edilmiştir.

0.80 a_w'de 5°C ve 15°C'de depolanan kırmızıbiberlerde AFB_1 değeri, 5. günde, 25°C ve 35°C'de depolanan kırmızıbiberlerde 7. günde maksimum seviyeye ulaşmıştır. 0.80 a_w'ye ayarlı kırmızıbiberlerin inkübasyon sürecinde en yüksek AFB_1 değerleri, 5, 15, 25 ve 35°C için sırasıyla 9.14, 9.75, 10.50 ve 11.21 ppb olarak tespit edilmiş ve depolamanın daha sonraki günlerinde tüm sıcaklık derecelerinde AFB_1 değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. 0.80 a_w'de depolanan kırmızıbiberlerin 20 gün sonunda tespit edilen AFB_1 değerleri, 6.43-9.22 ppb arasındadır. 0.80 a_w değerindeki numunelerin AFB_1 miktarları ile aynı a_w değerindeki numunelerin küf sayıları karşılaştırıldığında, küf sayısının en düşük olduğu 0.80 a_w-25°C'deki kırmızıbiberlerde, küf sayısının en yüksek olduğu 5°C'deki kırmızıbiberlerden istatistiki olarak önemli derecede daha fazla AFB_1 üretildiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, 0.80 a_w'deki kırmızıbiberlerin 25°C ve 35°C'de tespit edilen ortalama AFB_1 değerleri arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık olmadığı gözlenmiştir.

0.85 a_w'ye ayarlı olarak depolanan kırmızıbiberlerin, başlangıçta 7.60 ppb olan AFB_1 miktarı maksimum seviyeye, 5°C'de 5. gün, 15°C'de 4. günde ulaşılırken, 25°C ve 35°C'de 7. günlerde ulaşılmıştır. 5°C'de inkübe edilen kırmızıbiberlerin AFB_1 miktarı, 5. günde 10.19 ppb'ye yükseldikten sonra 20. gün 7.22 ppb'ye düşmüştür. 0.85 a_w'ye ayarlı olarak 15°C'de inkübe edilen kırmızıbiberlerde ise, AFB_1 miktarı 4. gün 10.66 ppb'ye yükselip 20. gün 9.43 ppb'ye gerilemiştir. 0.85 a_w'de tüm sıcaklıklarda depolanan kırmızıbiberlerin ortalama küf sayıları arasında istatistiksel olarak önemli bir

farklılık olmamasına rağmen, bu a_w'ye sahip kırmızıbiberlerin 25°C'de ve 35°C'de depolananlarına ait ortalama AFB_1 değerleri, 5°C'de ve 15°C'de depolananlarına ait AFB_1 değerlerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur.

0.90 a_w'ye ayarlı olarak 5°C ve 15°C'de depolanan kontamine kırmızıbiberlerde en yüksek AFB_1 miktarı, 5. günde sırasıyla 12.22 ve 14.85 ppb olarak tespit edilmiştir. 0.90 a_w'ye sahip kontamine kırmızıbiberlerin 25°C'de 20 gün depolanması sonunda AFB_1 seviyesinin 21.27 ppb'ye çıktığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, 35°C'de depolanan 0.90 a_w'ye ayarlı kontamine kırmızıbiberlerin 15. gün küf sayısının en üst seviyede olmasına paralel, AFB_1 seviyesi de en yüksek değerde (28.84 ppb) tespit edilmiştir. Aynı zamanda, 0.90 a_w'de ortalama küf sayısında olduğu gibi, 25°C'de ve 35°C'de depolanan numunelerin ortalama AFB_1 miktarları, 5°C'de ve 15°C'de depolanan numunelerin ortalama AFB_1 miktarlarından istatistiksel olarak önemli derecede yüksek bulunmuştur.

0.95 a_w'ye sahip kontamine kırmızıbiberlerin 5°C'de depolanması sürecinde, en yüksek AFB_1 miktarı 7. günde 15.24 ppb olarak ölçülmüştür. Bu değer, aynı zamanda 5°C'de farklı a_w değerlerinde depolanan tüm kırmızıbiberler içinde tespit edilen en yüksek AFB_1 miktarıdır. 0.95 a_w'de depolanan kırmızıbiberlerde 15. günde, 15°C, 25°C ve 35°C'de sırasıyla 20.95, 57.21, 61.56 ppb olmak üzere maksimum AFB_1 düzeylerine ulaşılmıştır. 35°C'de depolanan numunelerin 15. gününe ait AFB_1 değeri aynı zamanda tüm çalışma süresince elde edilen en yüksek AFB_1 değeridir ve bunu aynı koşuldaki numuneye ait 20. günde elde edilen AFB_1 değeri izlemiştir. 25°C'de depolanan örneklerin 20. günde elde edilen AFB_1 değeri ise, bu çalışma kapsamında elde edilen en yüksek 3. AFB_1 değeri olmuştur. Sonuçta, her iki sıcaklıkta depolanan numunelere ait ortalama AFB_1 değerlerinin, diğer sıcaklık derecelerindeki (5°C ve 15°C) numunelerin ortalama değerlerinden önemli derecede yüksek olduğu gözlenmiştir.

Tüm sıcaklık derecelerindeki kırmızıbiberlere ait ortalama AFB_1 değerlerinin, artan su aktivitesi ile birlikte arttığı gözlenmiştir. Ancak, 5°C ve 15°C'de, 0.80 ve 0.85 a_w'ye ayarlı olarak depolanan kırmızıbiberlerin ortalama AFB_1 değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmazken, $\geq$0.85 a_w'deki numunelerin ortalama AFB_1 değerlerinin istatistiksel olarak önemli derecede farklı olduğu tespit edilmiştir. 25°C ve

35°C'de ise, 0.95 a_w'de depolanan numunelerin ortalama AFB_1 değerleri, diğer a_w değerlerindeki numunelerden önemli derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca, 0.80 a_w-35°C koşulunda depolanan numunelerin ortalama AFB_1 değerinin de, istatistiksel olarak önemli derecede düşük olduğu gözlenmiştir.

Su aktivitesi, sıcaklık ve inkübasyon süresinin, *A. flavus*'un AFB_1 ve siklopiazonik asit (SPA) üretimine interaksiyon etkilerini tespit etmek amacıyla yapılan bir araştırmada [Astoreca ve ark., 2014], 0.83, 0.86, 0.90, 0.94, 0.96 ve 0.98 olmak üzere 6 a_w seviyesine ayarlanan Czapek Yeast Agar (CYA) ve mısır ekstraktı ile hazırlanan özel bir besiyeri Corn Extract Medium (CEM) kullanılmıştır. 10^6 spor/mL'lik fungal spor süspansiyonundan 5 µL kültür ortamlarına inoküle edilmiş ve petri kutuları aynı a_w'ye ayarlı polietilen torbalara konularak 10, 15, 25, 30, 35 ve 40°C'de 28 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 7, 14, 21 ve 28. günleri her bir petride gelişen küf kolonilerinden ekstrakte edilen AFB_1 ve SPA HPLC ile analiz edilmiştir. Sonuçta, kültür ortamına bağlı olarak mikotoksin üretiminde çok önemli farklılıklar gözlenmiş, CEM besiyerinde hemen hemen tüm koşullarda AFB_1 ya hiç saptanamamış ya da çok küçük seviyelerde (0.01-2.99 µg/g) kaydedilmiştir. Tüm besi ortamı ve izolatlarda maksimum AFB_1 üretiminin 0.96 a_w-30°C'de 21. günde olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada 28 günlük depolama süresince, hemen hemen tüm örneklerde AFB1 miktarının kırmızıbiber örneklerinde tespit edilen sonuçlara benzer olarak maksimum değere ulaştıktan sonra tekrar düşüşe geçtiği tespit edilmiştir. Yine kırmızıbiberlerde elde edilen sonuçlara benzer şekilde, a_w, sıcaklık ve inkübasyon süresi faktörlerinin AFB_1 üretimine etkisinin istatistiksel olarak oldukça önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, 10°C'de depolanan numunelerin hiçbirinde, 15°C'de depolanan numunelerin ise, ≤0.94 a_w'ye ayarlı olanlarında AFB_1 tespit edilmemesi kırmızıbiber çalışmasının sonuçları ile uyumlu değildir. Maksimum AFB_1 üretiminin görüldüğü koşullar ise, her iki çalışmada paralellik göstermektedir.

Abdel-Hadi ve ark. (2012), yaptıkları bir çalışmada, YES agarda aflatoksijenik *A. flavus*'un 9 gün inkübasyonu sonunda, AFB_1 üretimi için optimum koşulların 0.98-0.99 a_w ve 25-33°C olduğunu ifade etmişlerdir. YES kültür ortamında kaydedilen optimum AFB_1 üretimi a_w-sıcaklık şartları, bu çalışmada kırmızıbiberlerde tespit edilen optimum şartlara (0.95 a_w-25°C ve 0.95 a_w-35°C) oldukça benzerlik göstermektedir.

A. flavus ile kontamine edilen ve 25°C'de 21 gün muhafaza edilen kürlenmiş jambonların AFB_1 miktarları, 7, 14 ve 21. günlerde, 0.84 a_w değerindeki numunelerde sırasıyla 40, 123 ve 250 ppb; 0.92 a_w değerindeki numunelerde ise sırasıyla 34, 114 ve 240 ppb olarak tespit edilmiştir [Rodriguez ve ark., 2012b]. Bu sonuçlar, kırmızıbiberlerde 25°C'de 0.85 ve 0.90 a_w değerinde depolanan kırmızıbiberlerin AFB_1 miktarları ile karşılaştırıldığında, her iki a_w değerinde de 20 gün boyunca aflatoksin miktarında artış olması yönüyle uyumlu, ancak bu artışın jambonlarda su aktivitesine bağlı olarak belirgin bir fark göstermezken kırmızıbiberlerde su aktivitesi ile artması yönüyle uyumsuzdur.

Mousa ve ark. (2011), pirinçte 2 *A. flavus* izolatının gelişmesini ve aflatoksin üretimini karakterize etmek için yürüttükleri çalışmada, farklı sıcaklık (10, 15, 20, 25, 30, 37 ve 43°C) ve a_w (0.82, 0.86, 0.89, 0.92, 0.95, 0.98 ve 0.99) seviyelerinde gerçekleştirilen 3 haftalık inkübasyon sonrasında numunelerde aflatoksin analizi yapmışlardır. Sonuçta 10°C'de ve 43°C'de inkübe edilen pirinçlerin hiçbirinde aflatoksin tespit edilmezken, 15°C'de sadece $\geq$0.95 a_w'ye sahip numunelerde aflatoksin belirlenebilmiştir. Bu sonuçların kırmızıbiberlerde elde edilen bulgularla uyumlu olmamasının, bu iki çalışmada kullanılan substratların ve ürün kontaminasyon yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, pirinçte yapılan çalışmada, aflatoksin üretimi için optimum a_w değeri 0.98, optimum sıcaklık değeri ise 25°C olarak ifade edilmiştir. Bu çalışmada kırmızıbiberlerde 0.95 a_w'nin üstündeki değerlerin test edilmemesi, pirinç ve kırmızıbiber araştırmalarında elde edilen bulgularla karşılaştırma yapmayı zorlaştırmaktadır.

Gallo ve ark. (2010), Hazelnut Agar Medium (HAM) ve Yeast Extract Sucrose (YES) olmak üzere 2 farklı besi ortamında, aflatoksijenik *A. flavus*'un 28°C'de 7 gün inkübasyonu süresince AFB_1 üretimi takip edilmiştir. Araştırma sonunda, HAM besiyerinde 72 saat sonra AFB_1 üretimi başlamış ve inkübasyon sonuna kadar artarak devam etmiştir. YES besiyerinde ise 36 saat sonra AFB_1 üretimi başlamış, ancak 144. saatte maksimuma ulaştıktan sonra 168. saatte düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlar, aynı fungal kültürün farklı besi ortamlarında AFB_1 üretim profilinin değişebileceğini göstermiştir.

Su aktivitesi değerleri 0.85, 0.90 ve 0.95 olarak ayarlanan yer fıstıklarına aflatoksijenik *A. flavus* kontamine ettikten sonra 25°C'de 6 hafta süreyle inkübe eden ve bu süreçte her hafta aflatoksin analizi yapan Abdel-Hadi ve ark. (2010), maksimum AFB_1 seviyesini 0.90 ve 0.95 a_w'de 3 hafta depolanma sonrasında tespit etmişlerdir. Schmidt-Heydt ve ark. (2009) ise, YES besiyerinde *A. flavus*'un en yüksek aflatoksin üretimini 25°C'de 0.95 ve 0.99 a_w, 30°C'de 0.95 ve 0.99 a_w ve 35°C'de 0.95 ve 0.99 a_w koşullarında gerçekleştirdiğini ifade etmişlerdir.

Giorni ve ark. (2008)'nın 25°C'de PDA besiyerinde ve mısırda, farklı su aktivitesi ve modifiye atmosferin *A. flavus*'un AFB_1 üretimine etkisini izlemek için yaptıkları çalışmada, PDA besiyerinde 14 gün inkübasyon sonrası 0.92 a_w'de 541 ppb, 0.95 a_w'de 470 ppb AFB_1 tespit edilmiştir. Mısırda ise, bu durumun aksine, yine aynı gün 0.92 a_w'de 40 ppb, 0.95 a_w'de 216 ppb AFB_1 olduğu ifade edilmiştir. Mısırda AFB_1 üretimine su aktivitesinin ve zamanın etkisinin oldukça önemli olduğu sonucu, kırmızıbiberler için elde edilen varyans analizi sonucu ile tamamen aynıdır. Ayrıca, bu çalışmada da, aflatoksijenik küfle kontamine mısırlarda AFB_1 miktarının 7 gün sonra en yüksek değere ulaştıktan sonra düşüşe geçtiği gözlenmiştir. Bu gözlem, kırmızıbiberde de hemen hemen tüm koşullar için tespit edilen bir bulgu olmuştur.

Ribeiro ve ark. (2006), arpa köklerinde *A. flavus*'un aflatoksin üretimi üzerine farklı su aktivitesi (0.80, 0.90 ve 0.95) ve sıcaklık (25 ve 30°C) koşullarında inkübasyon süresinin (7, 14 ve 21 gün) etkisini tanımlamak için yaptıkları çalışmada, en yüksek AFB_1 miktarını, 0.95 a_w-25°C koşulunda 21 gün ve 0.80 a_w-25°C koşulunda ise 14 gün inkübe edilen numunelerde tespit etmişlerdir. Bu çalışma ile kırmızıbiberlerde yapılan çalışma bulguları karşılaştırıldığında, aynı koşullar test edilmemiş olmakla birlikte, aflatoksin üretimi için optimum koşulların, arpa kökleri ve kırmızıbiber için farklı olduğu görülmüştür.

Kırmızıbiber oleoresinlerinin ve karotenoid bileşenlerinin antifungal ve antiaflatoksijenik etkileri hakkında yapılmış bazı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, kırmızıbiberden ekstrakte edilen oleoresinin ağaç küfleri olan *Sphaeropsis sapinea* ve *Leptographium procerum*'a antifungal etkisi gösterilmiştir [Singh ve Chittenden, 2008]. Kırmızıbiber, karabiber, biberiye ve sarımsak oleoresinlerinin 6 *Aspergillus* izolatına karşı antifungal aktivitesinin araştırıldığı çalışmada [Soso ve ark., 2013], kırmızıbiber

oleoresinlerinin diğer test edilen numunelere göre daha düşük bir antifungal aktiviteye sahip olduğu, ancak 25 µL/mL konsantrasyonunun *A. clavatus* ve *A. versicolor* küflerini inhibe edebildiği tespit edilmiştir. Norton ve ark. (1997), 50 µg/mL konsantrasyonunda β-karotenin, *A. flavus*'un farklı suşlarının AFB_1 üretimini %89-96 arasında, ancak *A. parasiticus*'un AFB_1 üretimini daha düşük oranlarda inhibe ettiğini saptamışlardır. Kraikraun ve ark. (2008), kırmızıbiberlerin üretim aşamasında antraknoz etmeni olarak bilinen bir fungus türü olan *Colletotrichum capsici*'nin konidyal çimlenmesini önlemede kapsaisinin rolünü ortaya koymuşlardır. Masood ve ark. (2008), kapsantinin hem *A. flavus* gelişimi hem de toksin üretimi üzerine inhibe edici etkisini kanıtlamışlar ve kapsaisinin kapsantine göre daha düşük bir etkinliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Santos ve ark. (2010), 3 *A. flavus* izolatının Czapek Yeast Extract Agar (CYA) besi ortamında koloni büyüme hızları (mm/gün), lag faz süreleri (gün) ve aflatoksin üretimi üzerine kapsantin ve kapsorubin içeren bir karetonoid karışımının farklı oranlarının sıcaklığa bağlı olarak etkisini incelemişlerdir. 10°C'de hiçbir izolatın gelişemediği, 15°C'de sadece 2 izolatın çok zayıf bir gelişme gösterdiği ve 25°C'de karetonoid karışımının *A. flavus*'un koloni büyüme hızlarını düşürüp lag fazlarını uzattığı gözlenmiştir. Ancak, kapsantal ilavesinin aflatoksin üretimine etkisi net bir şekilde tespit edilememiş ve anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır. Kırmızıbiber bileşenlerinin antifungal ve antiaflatoksijenik etkileri üzerine yapılmış literatürdeki çalışmalarda, su aktivitesi ve sıcaklık faktörlerinin ve substrat olarak kırmızıbiberin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, kırmızıbiberlerde yaptığımız çalışmada depolama sürecinde küf sayısı ve AFB_1 miktarındaki azalmalar, literatürde yer alan araştırma bulguları ile tam olarak açıklanamamış ve değerlendirilememiştir.

4.3. Kontamine Kırmızıbiberlerin Depolama Sürecindeki *AflR, Nor-1* ve *PksA* Gen Ekspresyon Düzeyleri

Kontamine Kırmızıbiberlerde *AflR* Gen Ekspresyonu

Kırmızıbiber numuneleri aflatoksijenik fungal spor süspansiyonu ile kontamine edildikten hemen sonra yapılan analizler, 2.33-2.45 log kob/g arasında *aflR* gen ekspresyonu olduğunu göstermiştir.

0.80 a_w'de 5°C ve 25°C'de 3. gün, 15°C'de 7. gün ve 35°C'de 4. gün maksimum *aflR* gen kopya sayısı tespit edilmiştir. 0.85 a_w'de 5°C ve 25°C'de 4. gün, 15°C ve 35°C'de

3. gün maksimum *aflR* gen ekspresyonu olmuştur. 0.90 a_w'de 5°C'de 2. gün, 15°C'de 3. gün, 25°C'de 5. gün ve 35°C'de 4. gün maksimum *aflR* gen kopya sayısı saptanmıştır. 0.95 a_w'de ise tüm depolama sıcaklıklarında 5. gün en yüksek *aflR* gen ekspresyonu kaydedilmiştir. Aynı zamanda, 0.80 a_w'de 5°C ve 15°C'deki *aflR* gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı ($p>0.05$), 25°C ve 35°C'deki *aflR* gen ekspresyon düzeyleri arasındaki farkın ise önemli olduğu ($p<0.05$) bulunmuştur. 0.85 a_w'de tüm sıcaklıklarda *aflR* gen ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. 0.90 a_w'de ise, sadece 5°C'deki *aflR* gen ekspresyonunun, diğer sıcaklıklarda tespit edilen *aflR* gen ekspresyonundan farklı olduğu ($p<0.05$) görülmüştür. 0.95 a_w'deki *aflR* gen ekspresyonları incelendiğinde, ilginç bir şekilde 25°C ve 35°C'deki değerlerin 5°C ve 15°C'deki değerlerden istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu ($p<0.05$) bulunmuştur.

Çalışmada en yüksek *aflR* gen ekspresyon düzeylerinin sırasıyla, 0.90 a_w-35°C, 0.90 a_w-25°C, 0.95 a_w-25°C ve 0.95 a_w-35°C koşullarında kaydedilmesi ve bu koşulların aynı zamanda en yüksek AFB_1 üretiminin gerçekleştiği koşullar olması, *aflR* gen ekspresyonu ile AFB_1 arasında iyi bir korelasyon olduğunu düşündürmüştür. Ancak, AFB_1 üretimi üzerine faktörlerin etkilerini ortaya koyan varyans analizleri, AFB_1 üretimine *aflR* gen ekspresyon düzeyinin etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığını ($P>0.05$) göstermiştir. Sonuç olarak, bu genin kırmızıbiberlerde test edilen koşullarda aflatoksin üretimi için gösterge kabul edilebilecek bir faktör olmadığı anlaşılmıştır. Ayrıca, kırmızıbiberler için su aktivitesi, sıcaklık, zaman ve bunların interaksiyonlarından oluşan varyasyon kaynaklarının *aflR* gen ekspresyon düzeyindeki değişimi sadece %32 düzeyinde açıklayabilmesi, depolama sürecinde *aflR* gen ekspresyonunun anlamlı bir seyir izlemediğini ortaya koymuştur.

A. parasiticus'un gelişimi, aflatoksin biyosentezi, *aflR* ve *aflS* ekspresyonu üzerine, su aktivitesi ve sıcaklığın etkisi, 17-42°C arasındaki sıcaklıklar ve 0.90-0.99 a_w arasındaki su ativitesi değerleri için araştırılmıştır [Schmidt-Heydt ve ark., 2010]. Çalışmada, optimum küf gelişiminin 35°C'de olduğu, çalışılan her sıcaklık için a_w arttıkça gelişmenin arttığı, 17°C ve 42°C değerlerinin gelişme için sınır sıcaklıklar olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, sıcaklık ve su aktivitesi koşullarının AFB_1 ve AFG_1 sentezine etkileri ile küf gelişimine etkilerinin farklı olduğu görülmüştür. AFG_1 üretiminin 20-30°C

arasındaki sıcaklıklarda optimum düzeye ulaşırken, AFB_1 üretiminin 37°C gibi gelişmeye göre daha yüksek sıcaklıklarda en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. İki düzenleme geninin (*aflR* ve *aflS*) ekspresyonu ya AFB_1 (*aflR*) ile ya da AFG_1 (*aflS*) biyosentez profili ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca, *aflS:aflR* ekspresyon oranı hesaplanmıştır. AFG_1 biyosentezinin üretim profili ile 17 ve 30°C arasındaki yüksek oranlar benzerlik göstermiştir. 30°C üzerindeki sıcaklıklarda düşük oranlar görülmüştür. Sonuçlar, sıcaklığın AFB_1 için, su aktivitesinin ise AFG_1 için kritik parametreler olduğunu ortaya koymuştur.

Schmidt-Heydt ve ark. (2009), 6 sıcaklık (20, 25, 30, 35, 37 ve 42°C) ve 3 su aktivitesinde (0.90, 9.95 ve 9.99 a_w) *A. flavus*'un YES besi ortamında gelişen küf kolonilerinden ekstrakte edilen RNA'dan cDNA sentezi ve hibridizasyon sonrası *aflR* geni ve *aflR* genini aktive eden *aflS* geni nispi ekspresyon düzeylerini konfokal taramalı mikroskopta belirlemişlerdir. Çalışma sonunda, tüm koşullarda *aflR* gen ekspresyonunun aflatoksin miktarı ile anlamlı bir şekilde değişmediği, ancak *aflS*/*aflR* oranının aflatoksin biyosentezi için kritik bir değer olabileceği ortaya konmuştur. Bu sonuç, kırmızıbiberlerde *aflR* gen ekspresyonununun su aktivitesi, sıcaklık ve zamanla etkileşimindeki varyasyonun düşük determinasyon katsayısı (yaklaşık %32) ile uyumlu bulunmuştur.

Kontamine Kırmızıbiberlerde *Nor-1* Gen Ekspresyonu

Çalışmada, kontaminasyondan sonra yapılan 0. gün analizlerine göre, kırmızıbiberlerde inkübasyon öncesi ortalama 1.88-1.91 log kob/g arasında *nor-1* gen ekspresyonu olduğu anlaşılmıştır.

0.80 a_w'de 5°C, 15°C ve 25°C'de depolanan kırmızıbiberlerde 4. gün, 35°C'de ise 5. gün maksimum *nor-1* gen kopya sayısı tespit edilmiştir. 0.80 a_w'de en yüksek *nor-1* gen kopya sayısı, 25°C'de 4. gün tespit edilen 3.12 log kob/g'dır.

0.85 a_w'de tüm sıcaklıklarda farklı günlerde *nor-1* gen kopya sayısı en üst düzeye çıkmıştır. 5°C ve 15°C'de, sırasıyla 4 ve 5. günler maksimum seviyeye ulaştıktan sonra diğer günlerinde düşüşler kaydedilmiştir. 0.85 a_w 25°C'de ise 5. gündeki belirgin artış son güne kadar devam ederken, 0.85 a_w 35°C'de, 15. gün tespit edilen en yüksek *nor-1* gen kopya sayısının, 20. günde düştüğü tespit edilmiştir.

0.90 a_w'de, 0.85 a_w'de olduğu gibi, tüm sıcaklıklarda farklı günlerde *nor-1* gen kopya sayısı maksimum seviyeye ulaşırken, 25°C'de 15. gün, tüm çalışmada elde edilen en yüksek *nor-1* gen ekspresyonu (5.07 log kob/g) kaydedilmiştir. 35°C'de ise maksimum *nor-1* gen kopya sayısı 20. günde tespit edilmiştir.

0.95 a_w'de, 5°C'de 15. gün, 15°C'de, 10. gün, 25°C'de 7. gün, en yüksek *nor-1* gen kopya sayısı belirlenirken, 0.95 a_w 35°C'de ise, 20. günde maksimum *nor-1* gen ekspresyonu olmuştur.

Hem, 0.85 hem de 0.95 a_w'de ortalama *nor-1* gen ekspresyonu düzeylerinin, 25 ve 35°C'de, 5 ve 15°C'den istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). 0.90 a_w'de, 25°C'de belirlenen ortalalama *nor-1* gen ekspresyon düzeyinin, 5 ve 15°C'den istatistiksel olarak daha yüksek olduğu ($p<0.05$), 35°C'den ise istatistiksel olarak farksız olduğu ($p>0.05$) bulunmuştur. 0.80 a_w'de 25 ve 35°C'deki ortalama *nor-1* gen ekspresyonu düzeylerinin 5°C'deki ortalama *nor-1* gen ekspresyonu düzeylerinden istatistiksel olarak önemli ölçüde daha yüksek olduğu ($p<0.05$), ancak 15°C'dekinden istatistiksel olarak farksız olduğu ($p>0.05$) bulunmuştur.

25 ve 35°C'de, 0.85, 0.90 ve 0.95 a_w'ye sahip kırmızıbiberlerin ekstrakte edilen RNA numunelerinden belirlenen ortalama *nor-1* gen ekspresyon düzeyleri, 0.80 a_w'ye sahip numunelerin ortalama *nor-1* gen ekspresyon düzeyinden istatistiksel olarak $p<0.05$ önem düzeyinde büyük bulunmuştur. 15°C'de depolanan ve 0.90 ve 0.95 a_w'de olan kırmızıbiberlerin ortalama *nor-1* gen ekspresyon düzeyleri de, 0.80 a_w'de olan numunelerden istatistiksel olarak önemli derecede fazla ($p<0.05$), 0.85 a_w'de olan numunelerden istatistiksel olarak farksız ($p>0.05$) bulunmuştur. 5°C'de depolanan numunelerde en düşük ortalama *nor-1* gen ekspresyon düzeyi, 0.90 a_w'ye sahip numunelerde tespit edilmiştir. 5°C'de, 0.95 a_w'de depolanan numunelerin ortalama *nor-1* gen ekspresyon düzeyleri, 0.80 ve 0.90 a_w'de depolanan numunelere ait ortalama *nor-1* gen ekspresyon düzeylerinden önemli düzeyde fazla ($p<0.05$), 0.85 a_w'de depolanan numunelere ait ortalama *nor-1* gen ekspresyon düzeyinden ise farksız ($p>0.05$) bulunmuştur.

Güney Afrika'da aflatoksin tespit edilen 31 karma yem numunesinden izole edilen 92 fungal suşun DNA'larında *nor-1* geni kantifiye edilmiş ve yem numunelerindeki

aflatoksin miktarları ile karşılaştırılmıştır [Iheanacho ve ark., 2014]. Sonuçta, aflatoksin düzeyleri ile *nor-1* gen seviyeleri arasında iyi bir korelasyon görülmediği ifade edilmiştir.

Jamali ve ark. (2013), fıstık bahçelerinin topraklarından izole edilen 24 *A. flavus* suşunun YES sıvı besiyerinde 28°C'de 4 günlük kültürlerinde, aralarında *aflD* (*nor-1*) geni de bulunan 4 aflatoksin biyosentez metabolik yolu geninin ekpresyon düzeylerini ölçmüşler ve aynı zamanda AFB_1 miktarlarını tespit etmişlerdir. Alınan verilerle, bu 4 genin (*aflD*, *aflO*, *aflP* ve *aflQ*) ekpresyonu ile AFB_1 miktarları arasında her zaman bir korelasyon olmadığı sonucuna varmışlardır.

Scherm ve ark. (2005), 5'i aflatoksijenik olan 10 *A. flavus* suşu ve 2'si aflatoksijenik olan 3 *A. parasiticus* suşunun 25°C'de hem YES hem YEP besiyerindeki 5 günlük kültürlerinden toplanan misellerinden aflatoksin ekstraksiyonu yapmışlar ve ters transkripsiyon GZ-PZR tekniği ile 11 gen (*aflD, aflG, aflH, aflI, aflK, aflM, aflO, aflP, aflQ, aflR* ve *aflS*) için amplifikasyon yürütmüşlerdir. Araştırma sonunda, *aflD* (*nor-1*), *aflO* ve *aflP* genleri dışında diğer test edilen genlerin, fungal suşun gerçek toksisitesini yansıtmadığı sonucuna varılmıştır.

Kontamine Kırmızıbiberlerde *PksA* Gen Ekspresyonu

Çalışmanın başlangıcında, kırmızıbiber numunelerinden ekstrakte edilen RNA ile yapılan GZ-PZR ve gen kopya sayısı belirleme analizleri, numunelerde ortalama 2.05 log kob/g *pksA* gen ekspresyonu olduğunu göstermiştir.

0.80 a_w'de tüm sıcaklıklarda depolanan kırmızıbiberlerde 4. gün maksimum *pksA* gen kopya sayısı tespit edilmiştir.

0.85 a_w'de 5°C ve 15°C'de 5. gün en yüksek *pksA* gen ekspresyonu olurken, 25°C'de depolamanın 10. günündeki *pksA* gen ekspresyonundaki belirgin yükseliş, son güne kadar devam etmiştir. 0.85 a_w'de 35°C'de ise, 15. gün *pksA* gen ekspresyonunun düzenli artışı ve 20. gün azalmaya başlaması dikkat çekmiştir.

0.90 a_w'de 5°C'de depolama sürecinde *pksA* gen ekspresyonunda en üst seviyeye ulaşıldıktan sonra 20. güne kadar tekrar düşüş gözlenmiştir. 15°C'de ise, 10, 15 ve 20.

gündeki belirgin artışlar dikkat çekmiştir. 25°C ve 35°C'de ise 3. gün hızlanan ekspresyon düzeyi 20. güne kadar artmaya devam etmiştir.

0.95 a_w'de 5°C'de inkübasyona bırakılan numunelerde, 0.90 a_w'ye göre daha erken *pksA* gen ekspresyonu olmuş, ancak 15°C ve 25°C'deki ekspresyon düzeylerinin artış eğilimi, 0.90 a_w'de depolanan numunelerle benzerlik göstermiştir. 0.95 a_w ve 35°C'de inkübe edilen numunelerde ise, 10. günden sonra *pksA* gen ekspresyonununda düşüş tespit edilmiştir.

Tüm çalışma parametreleri dikkate alındığında, *pksA* gen ekspresyonu için en uygun koşulların sırasıyla, 0.90 a_w-25°C, 0.90 a_w-35°C ve 0.95 a_w-25°C olduğu görülmüştür.

0.80 a_w'ye sahip kırmızıbiberlerin ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeylerinin, en fazla 35°C'de depolanan numunelerde olduğu, 15 ve 25°C'de depolanan numunelerin ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeylerinin 5°C'de depolanan numunelerin ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeylerinden istatistiksel olarak önemli seviyede fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). 0.85, 0.90 ve 0.95 a_w'ye sahip kırmızıbiberlerin ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeylerinin ise sıcaklıklara göre aynı şekilde değişim gösterdiği görülmüştür. Bu 3 a_w (0.85, 0.90 ve 0.95 a_w) seviyesinde, 25 ve 35°C'de, 5 ve 15°C'de depolananlardan istatistiksel olarak daha fazla ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeyi olduğu anlaşılmıştır ($p<0.05$).

25 ve 35°C'de depolanan kırmızıbiberlerin ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeylerinin, en fazla 0.90 a_w'ye sahip numunelerde olduğu ve 0.95 a_w'ye sahip numunelerin ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeylerinin, 0.90 a_w'den farklı olmadığı, ancak 0.85 ve 0.80 a_w'den önemli seviyede fazla olduğu tespit edilmiştir. 15°C'de depolanan numunelerde ise, 0.90 ve 0.95 a_w'ye sahip numunelerin ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeylerinin diğer a_w'ye sahip numunelerin ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeylerinden önemli seviyede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). 5°C'de depolanan numunelerde de, 0.95 ve 0.90 a_w'ye sahip numunelerin ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeyleri farklı bulunmazken ($p>0.05$), 0.85 ve 0.80 a_w'ye sahip numunelerin ortalama *pksA* gen ekspresyon düzeylerinden önemli seviyede fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Literatürde, aflatoksin metabolik yolu yapısal genlerinden *pksA* geninin ekspresyon düzeyinin besi ortamında ya da gıdada tespit edilerek aflatoksin üretimi ile karşılaştırıldığı başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sadece, *A. nidulans* ve *A. parasiticus* suşlarında aflatoksin ve sterigmatosistin biyosentezi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada, *A. nidulans*'da *pksA* geninin 27°C'de ekspres olduğu, ancak 37°C'de ekspres olmadığı tespit edilmiştir [Guo ve Leonard, 1998].

4.4. Kontamine Kırmızıbiberlerde AFB_1 Üretimi ile Su Aktivitesi, Sıcaklık, Zaman, Gen (*AflR, Nor-1* ve *PksA*) Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiyi İfade Eden Matematiksel Model

Bu çalışmada, farklı koşullarda 20 gün depolanan aflatoksijenik NRRL 3357 *A. flavus* ile kontamine kırmızıbiberlerde belli periyotlarla tespit edilen gen ekspresyon düzeyleri ile AFB_1 üretimi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak üzere, YYM ile modelleme yapılmıştır. Bunun için, her bir su aktivitesi ve her bir sıcaklık düzeyi sabit tutularak diğer faktörlerin değişken olduğu 8 model oluşturulmuştur. Bu modellerin uygunlukları, 3. Bölüm'de değerlendirilmiştir.

Literatürde, aflatoksin miktarı ile gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik bazı modelleme çalışmaları mevcuttur.

Garcia ve ark. (2013), aflatoksijenik *A. flavus* suşunun mısırla hazırlanan besi ortamlarında 0.90 ve 0.99 a_w'de, 25°C'de mikotoksin üretme kinetiğinin modellenmesi amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada, PDA petrilerinde 25°C'de 7 gün geliştirilen yoğun sporlu kültür ile 10^4 spor/mL konsantrasyonunda spor süspansiyonu hazırlanmış ve 60 adet Mısırlı Agar Besiyeri (MAB)'nin ve 30 adet Mısır Taneli Besiyeri (MTB)'nin a_w'leri hedef a_w değerlerine getirilmiştir. Her bir petriye 1-5x10^4 spor/mL fungal spor süspansiyonundan inoküle edilmiş ve gliserol:su karışımlı kapaklı geniş beherler içinde 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 30 gün boyunca, her bir petriden 3 adet 4 mm çapında koloni alınarak aflatoksin ekstraksiyonu yapılmış, aynı zamanda kolonilerin yarıçapları ölçülmüş ve misel kuru ağırlıkları analiz edilmiştir. Araştırma verileri, farklı matematiksel modeller kullanılarak açıklanmaya çalışılmıştır. Sonuçta, koloni yarıçapı ve misel kuru ağırlığı ile a_w arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur. MTB ortamında AFB_1 üretiminin 36 saat

sonra arttığı, 2-4. günler arası en yüksek artış hızının olduğu, 4. günde pik yaptığı, bir durağan ve artış dönemleri sonrası düzensiz seyir izlediği görülmüştür. MAB petrilerindeki AFB_1 içeriğinin ise, 2. günden sonra inkübasyonun 7. gününe kadar arttığı, 8-10. günler düşüş olduğu ve 23. gün maksimuma ulaştığı ve sonra düzensiz seyir izlediği tespit edilmiştir. Aflatoksin analiz sonuçlarının 30 gün boyunca, özellikle 10 günden sonra çok kıvrımlı bir seyir izlediği araştırmada, mısır substratı için AFB_1 üretimi, Luedeking-Piret modeli ile kısmen makul olarak açıklanmış, ancak sonuçta bu modelin net tahminler almakta kullanılamayacağı şeklinde değerlendirme yapılmıştır.

Mısırdan izole edilen 3 *A. flavus* suşunun gelişme oranı ve gelişme sınırlarına iki kültür ortamında izlenen sıcaklık (10-40°C) ve a_w (0.80-0.98) parametrelerinin etkilerini modellemek için bir çalışma yapılmıştır [Astoreca ve ark., 2012]. CYA'da elde edilen gelişme oranlarının, CEM besiyerinde elde edilenlerden belirgin bir şekilde daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan 3 *A. flavus* izolatı arasında belirgin farklılıklar gözlenmemiştir. Olasılık modeli, nemli mısır (0.90 a_w) için 15°C altında, kuru mısır (0.80 a_w) için 27°C altında depolamanın güvenli olduğunu göstermiştir. Ayrıca, 0.77 a_w'den daha düşük su aktivitesinde depolamanın, depolama sıcaklığına bakılmaksızın güvenli olacağı sonucuna varılmıştır.

Abdel-Hadi ve ark. (2012), sıcaklık ve su aktivitesinin, hem biyosentez genlerinin ekspresyonunu hem ikincil metabolitlerin üretimini belirgin bir şekilde etkilediğini göstermişlerdir. 0.85, 0.90, 0.95 ve 0.99'a ayarlanmış modifiye YES agar besiyerlerine 5 µL 10^6 spor/mL NRRL 3357 *A. flavus* spor süspansiyonu inoküle ederek 20, 25, 30 ve 35°C'de inkübasyona bırakmışlardır. 9 gün sonunda, RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmış, cDNA örnekleri vakum konsantratörde kurutulduktan sonra hibridizasyon tampon çözeltisi ile süspanse edilip otomatik hibridizasyon istasyonunda 42°C'de 18 saat hibritleme yapılmıştır. Hibridizasyon sonrası dizilim, bir konfokal lazer sistemle taranarak *aflD* (*nor-1*), *aflM, aflR* ve *aflS* genlerinin nispi çokluğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, fungal kolonilerden aflatoksin ekstraksiyonu yapılmış ve HPLC ile AFB_1 miktarları belirlenmiştir. Sonuçta, sıcaklık arttıkça *aflD* ve *aflR* ekspresyonunun azaldığı, a_w yükseldikçe de *aflD* ekspresyonunun azalırken *aflR* ekspresyonunun düzenli bir değişim göstermediği ifade edilmiştir. Kırmızıbiberlerde yapılan çalışmada, tüm su aktivitesi ve sıcaklıklar için, gen ekspresyonu ile bağlantılı düzenli bir artma ya da

azalma gözlenememiş, sıcaklık artışı ile *nor-1* gen ekspresyonunun artışı, sadece 0.85 a_w'ye sahip kırmızıbiberler için geçerli bir bulgu olmuştur.

Pirinçte, su aktivitesi ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak iki *A. flavus* suşunun gelişme oranını kinetik modellerle tanımlamak üzere tam faktöriyel tasarıma uygun olarak bir araştırma yapılmıştır [Mousa ve ark., 2012]. Pirinç tanelerinden hazırlanan ve a_w ayarı yapılan petri kutularının merkezine daha önce PDA besiyerinde 30°C'de 10 gün geliştirilmiş kültürlerden inoküle edilmiş ve planlanan sıcaklık seviyelerinde 3 hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinde her gün fungal koloni çapı izlenmiş ve 3 hafta sonunda ise HPLC ile aflatoksin analizi yapılmıştır. Araştırma sonunda, her iki izolatın da maksimum koloni gelişme oranları, Baranyi primer modeline uygun veriler ortaya koymuştur. Ayrıca, Rosso, Davey ve polinomiyal olmak üzere üç adet ikinci derece model denenmiştir. Çalışılan tüm modeller, gözlenen gelişme oranları ile iyi bir uyum sergilerken Davey modelinin en iyi deneysel tahminlemeyi yapabildiği kanıtlanmıştır. Sonuçta, *A. flavus*'un gelişimi ve aflatoksin üretimi üzerine a_w ve sıcaklığın tek tek ve interaksiyon etkilerinin önemli olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara benzer olarak, kırmızıbiberlerde yapılan çalışmada da, hem *A. flavus*'un kültürel gelişimi üzerine hem de AFB_1 üretimi üzerine su aktivitesinin, sıcaklığın ve su aktivitesi-sıcaklık interaksiyonlarının etkilerinin oldukça önemli olduğu tespit edilmiştir.

İspanya'da şamfıstığından izole edilen aflatoksijenik *A. flavus*'un gelişimini ve aflatoksin üretimini, fıstıkların nem içeriğinin ve depolama sıcaklıklarının bir fonksiyonu olarak tahminlemek üzere model oluşturmak amacıyla bir çalışma yapılmıştır [Marín ve ark., 2012]. 250 g kabuksuz şamfıstığı içeren 35 adet kavanoz otoklavlanarak sterilize edildikten sonra nem içerikleri %10, %15, %20, %25 ve %30 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir kavanoz 10 petri kutusuna ince bir tabaka halinde boşaltılmış ve 10^6 spor/mL konsantrasyonunda spor süspansiyonundan bir öze dolusu inoküle edilmiştir. Aynı nem içeriğinde olan 10 petri kutusu, inkübasyon sürecinde aynı nispi nemi koruması için ayarlanmış gliserol+su karışımları içeren plastik kutulara yerleştirilmiştir. Plastik kutular, 10, 15, 20, 25, 30, 37 ve 42°C'de 32 gün inkübasyona bırakılmıştır. Her bir nem içeriği ve sıcaklıkta 2 dönem aflatoksin verisi alacak şekilde 6, 15, 32. günler ve ilave olarak validasyon çalışması için 67. günler analizlere alınmıştır. Ayrıca, 2 hafta boyunca koloni çapı ölçümleri yapılmıştır. %10 nem içeriğindeki numunede, 10 ve 42°C'de inkübe edilen numunelerde küf gelişimi

gözlenmemiştir. Aynı zamanda 15°C'de, sadece %20 ve %30 nem içerikli numunelerde küf gelişimi olmuştur. Araştırma sonunda, denenen şartlar için küfün gelişmesini tahmin etmek amacıyla, hem kinetik hem olasılık modelleri oluşturulmuştur. Radyal gelişme oranı, sıcaklık ve a_w'nin bir fonksiyonu olarak daha önce geliştirilen mevcut 3 ayrı kinetik modele adapte edilmiş, en iyi uyumu çok faktörlü kardinal modelde göstermiştir. Aflatoksin varlığı için, en iyi 32 gün inkübasyon durumunda %89.4 doğru tahmin yapılabileceği, %5.1 yanlış pozitiflik, %5.5 yanlış negatiflik olabileceği ifade edilmiştir.

Abdel-Hadi ve ark. (2010), *A. flavus* ile kontamine edilen ve 25°C'de inkübe edilen 3 a_w seviyesindeki (0.85, 0.90 ve 0.95) yer fıstıklarında *nor-1*, *ver-1*, *omtA* ve *aflR* gen ekspresyonunu 6 hafta boyunca haftada bir analiz etmişlerdir. Taranan 4 genin, 0.95 a_w'de 6 hafta süresinde ekspres olduğu görülmüştür. Üç a_w seviyesindeki yer fıstıklarında *nor-1* ekspresyonunda belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Özellikle 1. ve 3. haftalar arasında 0.90 a_w'de daha yüksek ekspresyon olduğu tespit edilmiştir. 0.95 a_w'de, 0.90 a_w'den daha düşük *nor-1* gen ekspresyonu olmuştur. En yüksek *nor-1* ekspresyonu, 0.95 a_w'de 3 hafta sonra tespit edilmekle birlikte daha sonra azalma olduğu, ilk 2 hafta boyunca 0.85 a_w'de, hiç *nor-1* ekpresyonu olmadığı ve akabinde çok düşük ekspresyon olduğu da çalışmanın bulguları arasındadır. Yer fıstığı modelinde, *A. flavus* gelişimi, AFB_1 üretimi ve *nor-1* gen ekspresyonu üzerine zaman ve su aktivitesinin tek tek ve interaksiyon etkileri, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu istatistiksel bulgular, kırmızıbiber çalışmasında elde edilen istatistiksel bulgularla benzerdir.

Gallo ve ark. (2010), HAM ve YES besiyerlerinde *A. flavus*'un 28°C'de 7 gün inkübasyonu sürecinde, gelişen misellerden RNA ekstraksiyonu yapmışlar RT-PZR ile *aflR, aflS, aflD*, *aflM*, *aflO*, *aflP* ve *aflQ* genlerinin transkripsiyon seviyelerini belirlemişlerdir. Bu araştırmada ele alınan 7 genin de, YES besiyerinde birbirlerinden farklı zamanlarda ekspres olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, HAM besiyerinde gen ekspresyon profillerinde YES besiyerine göre daha belirgin farklılıklar tespit edilmiştir. Diğer zaman aralıklarında ekspresyon seviyesi *aflS*'ye göre daha düşük olan *aflR*, 72-120. saatler arasında transkripsiyonda pik yapmıştır. HAM besiyerinde, 5 yapısal gen de, birbirine çok benzeyen bir ekspresyon profili göstermiş ve en yüksek ekspresyon oranları 72-96 saatler arasında kaydedilmiştir. Diğer zamanlarda bu genlerin

transkripsiyon seviyesi, YES besiyerinde kaydedilenden daha düşük olmuştur. Aynı zamanda, yapısal genlerin ekspresyonu, *aflR* ve *aflS*'ye göre daha geç olmuştur.

Başka bir çalışmada ise, sıcaklık (20, 25, 30, 37°C), su aktivitesi (0.85, 0.90, 0.95 ve 0.996), inkübasyon süresi (5, 10, 15 ve 20 gün) ve kültür ortamının (YEA ve Czapek Yeast Atolysate Agar), *A. flavus*'un aflatoksin ve siklopiazonik asit (SPA) üretimine etkisi tam faktöriyel deney tasarımı kullanılarak araştırılmıştır [Gqualeni ve ark., 1997]. Sonuç olarak, aflatoksin üretimi için optimum koşullar 30°C ve 0.996 a_w olarak belirlenmiştir. Tüm faktörlerin tek tek ve interaksiyon etkilerinin istatistiksel olarak önemli olduğu bulgusu, kırmızıbiberlerdeki AFB_1 üretimini etkileyen faktörlerin varyans analizi bulguları ile uyumludur.

4.5. Çalışma Sonunda Elde Edilen Önemli Bulgular ve Tespitler

Tam faktöriyel deney tasarımına göre yürütülen bu çalışmada, aflatoksijenik NRRL 3357 *A. flavus*'un spor süspansiyonu ile kontamine edilen kırmızıbiber numuneleri, 4 su aktivitesi (0.80, 0.85, 0.90 ve 0.95) ve 4 sıcaklık (5, 15, 25 ve 35°C) kombinasyonundan oluşan 16 farklı koşulda 20 gün süreyle depolanmıştır. Depolama boyunca 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 ve 20. günlerde numunelerde, küf sayıları ve aflatoksin miktarları tespit edilmiştir. Numunelerden toplam RNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra ters transkripsiyon GZ-PZR ile aflatoksijenik fungusların aflatoksin biyosentezinde görev alan düzenleyici *aflR* geni ile yapısal *nor-1* ve *pksA* genleri kantitatif olarak analiz edilmiştir. GZ-PZR ile elde edilen sayısal veriler (Cq değerleri) ile RNA numunelerindeki hedef genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki, analiz edilen her bir gen *E. coli* DH5-α suşunda klonlanarak logaritmik gen kopya sayısı cinsinden bulunmuştur.

Çalışma sonunda elde edilen belli başlı bulgular aşağıda kısaca özetlenmiştir:

- Kırmızıbiberlerde 0.80-0.95 su aktivitesi ve 5-35°C sıcaklık aralıklarında 20 gün depolama durumunda *A. flavus* küf gelişimi üzerine, su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın etkilerinin önemli olduğu tespit edilmiştir. Test edilen parametreler içinde, en düşük küf gelişiminin sırasıyla 0.80 a_w-25°C, 0.80 a_w-35°C, 0.80 a_w-15°C koşullarında olduğu görülmüştür.

- Bu çalışmada, *A. flavus* suşu gelişimi için literatürde bildirilen sıcaklık ve a_w koşulu hakkındaki genel bilgi ve verilerin aksine, *A. flavus* ile kontamine kırmızıbiberlerde 0.80 ve 0.85 a_w'de sıcaklık artarken küf gelişiminin azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum, muhtemelen kırmızıbiberlerde bulunan antifungal bileşenlerin aktivitesini, *A. flavus* gelişimi ile farklı koşullarda göstermesinden kaynaklandığını düşündürmüştür.
- Kırmızıbiberlerde *A. flavus*'un AFB_1 üretimi üzerine su aktivitesi, sıcaklık ve zamanın etkileri tespit edilmiştir. Test edilen parametreler içinde, en düşük AFB_1 miktarının sırasıyla 0.80 a_w-5°C, 0.85 a_w-5°C ve 0.80 a_w-15°C koşullarında depolanan kırmızıbiberlerde olduğu görülmüştür.
- Kırmızıbiberlerde, *A. flavus*'un aflatoksin biyosentez metabolik yolu düzenleyici geni *aflR*'nin ekspresyonunun, test edilen su aktivitesi ve sıcaklık koşullarında zamanla değişimi izlenmiştir. Bunun sonunda, tüm varyasyon kaynaklarının *aflR* gen ekspresyonundaki değişimi sadece %32 düzeyinde açıklayabildiği anlaşılmıştır.
- Kırmızıbiberlerde, *A. flavus*'un aflatoksin biyosentez metabolik yolu yapısal genlerinden *nor-1*'in ekspresyonunun, test edilen su aktivitesi ve sıcaklık koşullarında zamanla değişimi izlenmiştir. Bunun sonunda, tüm varyasyon kaynaklarının *nor-1* gen ekspresyonundaki değişimi yaklaşık %65 oranında açıklayabildiği anlaşılmıştır.
- Kırmızıbiberlerde, *A. flavus*'un aflatoksin biyosentezi için gerekli olan poliketid omurgasının oluşturulmasını kataliz eden *pksA* geninin ekspresyonunun, test edilen su aktivitesi ve sıcaklık koşullarında ve zamanla değişimi izlenmiştir. Bunun sonunda, tüm varyasyon kaynaklarının *pksA* gen ekspresyonundaki değişimi yaklaşık %77 oranında açıklayabildiği anlaşılmıştır. Bu oran, çalışmada denemeye alınan 3 aflatoksin biyosentez yolu geni arasında, su aktivitesi, sıcaklık ve zamanla en anlamlı değişim gösteren genin *pksA* geni olduğunu ortaya koymuştur.
- Kırmızıbiberlerde *A. flavus*'un AFB_1 üretimi, 4 su aktivitesi için ayrı ayrı olmak üzere sıcaklık, zaman ve gen ekspresyon düzeylerinin fonksiyonu olarak YYM ile modellenerek 4 model oluşturulmuştur. Modellerde yer alan varyasyon kaynaklarının AFB_1 miktarında oluşan varyansı açıklama oranları esas

alındığında, en uygun model 0.95 a_w için oluşturulan model olmuştur (R^2_{adj}= 94.21).

- Kırmızıbiberlerde *A. flavus*'un AFB_1 üretimi, 4 sıcaklık için ayrı ayrı olmak üzere su aktivitesi, zaman ve gen ekspresyon düzeylerinin fonksiyonu olarak YYM ile modellenerek 4 model oluşturulmuştur. Modellerde yer alan varyasyon kaynaklarının AFB_1 miktarında oluşan varyansı açıklama oranları esas alındığında, en uygun model 25°C için oluşturulan model olmuştur (R^2_{adj}= 94.68).

Çalışma sonunda, araştırma konusu ile ilgili şu öneriler yapılabilir:

- Bu çalışma, kırmızıbiberlerde su aktivitesi, sıcaklık ve zamanla aflatoksijenik *A. flavus*'un kültürel gelişiminin, AFB_1 üretiminin ve gen ekspresyon düzeylerinin izlendiği ilk çalışmadır. Bu çalışma bulgularının daha iyi değerlendirilebilmesi için, aynı faktörler farklı aflatoksijenik suşlarla ve aynı aflatoksijenik suş farklı faktörlerle olmak üzere başka çalışmalar yapılmasında yarar vardır.
- Literatürde, aflatoksin biyosentez mekanizmasının, substrata, fungal suşa, su aktivitesine, sıcaklığa, zamana ve diğer tüm ortam koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterdiği yönünde bilgiler mevcuttur. Ancak, aflatoksin sorununun çözümü için, bu kompleks mekanizmanın spesifik ürünler bazında aydınlatılması gerekmektedir. Bunun için, aflatoksin sorunu ile adı anılan gıdalarda (fındık, incir vb), olası kontaminasyon etmeni küflerle ve farklı çevresel koşullarda, aflatoksin biyosentez metabolik yolunun farklı genlerinin ekspresyon düzeyleri araştırılmalıdır. Böylece, söz konusu küfe ve ürüne özgü aflatoksin üretimini indükleyen veya baskılayan koşulların ve metabolik yolda rol oynayan kilit genlerin tespit edilmesi ve bu doğrultuda önlemler geliştirilmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Abdel-Hadi, A., Carter, D., Magan, N., 2010. Temporal monitoring of the *nor-1* (*aflD*) gene of *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin B_1 production during storage of peanuts under different water activity levels. Journal of Applied Microbiology, 109 (6): 1914-1922.

2. Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N., 2012. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. Journal of The Royal Society Interface, 9: 757-767.

3. Ağaoğlu, S., 1999. Van ilinde açıkta satılan kırmızı pul biberlerde aflatoksin B_1 varlığının araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Van Tıp Dergisi, 6 (4): 28-30.

4. Akgül, A., 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Dergisi Yayınları, No: 15, Ankara, 451 s.

5. Alldrick, A.J., Van Egmond, H.P., Solfrizzo, M., 2009. Mycotoxins: Food safety management implications. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 1 (3): 153-159.

6. Anonim, 2011. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. (Web sayfası: http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8.htm), (Erişim tarihi: Şubat 2014).

7. Anonymous, 2004. Life Technologies TA Cloning Kit Version V. (Web sayfası: RNeasy Mini Handbook. (Web sayfası: https://www.google.com.tr/#q=mvz.berkeley.edu%2Fegl%2Finserts%2FTAcloning.pdf), (Erişim tarihi: Haziran 2014).

8. Anonymous, 2004. Outbreak of aflatoxin poisoning-Eastern and central provinces, Kenya, January-July 2004. (Web sayfası: http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5334.pdf), (Erişim tarihi: Ocak 2014).

9. Anonymous, 2011. QIAGEN QuantiFast SYBR Green RT-PCR Handbook. (Web sayfası: http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center), (Erişim tarihi: Ocak 2013).

10. Anonymous, 2012a. QIAGEN RNeasy Mini Handbook. (Web sayfası: http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center), (Erişim tarihi: Ocak 2013).

11. Anonymous, 2012b. Invitrogen PureLink Genomic DNA Kits User Guide. (Web sayfası: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_mini_man.pdf), (Erişim tarihi: Haziran 2014).

12. Anonymous, 2014a. The aflatoxins. (Web sayfası: http://www.micotoxinas.com.br/Aflafacts.pdf), (Erişim tarihi: Ocak 2014).

13. Anonymous, 2014b. Fungi: More on Morphology (Web sayfası: http://www.ucmp.berkeley.edu/fungi/fungimm.html), (Erişim tarihi: Ocak 2014).

14. Anonymous, 2014c. Manual of Compliance Policy Guides. (Web sayfası: http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/cpgvet/cpg683-100.html), (Erişim tarihi: Şubat 2014).

15. AOAC Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 2000. Method No: 999.07.

16. AOAC Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 2005. International Vol 88, No.2.

17. Aran, N., 2010. Gıda Biyoteknolojisi, Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın No: 57, 1. Baskı, Ankara.

18. Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Marin, S., Ramos, A., 2014. Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B_1 and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. Food Microbiology, 38: 276-283.

19. Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Ramos, A.J., Marín, S., 2012. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. International Journal of Food Microbiology, 156: 60-67.

20. Aydin, A., Erkan, M.E., Baskaya, R., Ciftcioglu, G., 2007. Determination of aflatoxin B_1 levels in powdered red pepper. Food Control, 18: 1015-1018.

21. Beis, S.H., 1990. Kırmızıbiberden Gıda Boyası Eldesi. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 27 s.

22. Bennett J.W., 2010. An overview of the genus *Aspergillus*, pp. 1-17. *In:* Aspergillus: Molecular Biology and Genomics. (Eds. M. Mashida, K. Gomi). Caister Academic Press, United Kingdom.

23. Bennett, J.W., 1981. Loss of Norsolorinic Acid and Aflatoxin Production by a Mutant of *Aspergillus parasiticus*. Journal of General Microbiology, 124: 429-432.

24. Bhat, R., Rai, R.V., Karim, A.A., 2009. Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety, 10: 57-81.

25. Bhat, R., Rai, R.V., Karim, A.A., 2009. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety, 10: 57-81.

26. Bhat, R.V., Miller, J.D., 1991. Mycotoxins and food supply. Food Nutrition and Agriculture, 1: 27-31.

27. Bhatnagar, D., Cary, J.W., Ehrlich, K., Yu, J., Cleveland, T.E., 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. Mycopathologia,162 (3): 155-166.

28. Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C., Cleveland, T.E., 1992. Oxidation-reduction reactions in biosythesis of secondary metabolites, pp. 255-286. *In*: Handbook of Applied Mycology Volume 5: Mycotoxins in Ecological Systems (Eds: D. Bhatnagar, E.B. Lillehoj, D.K. Arora). Marcel Dekker, New York.

29. Bircan, C., 2005. The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. International Journal of Food Science and Technology, 40: 929-934.

30. Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P., 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66 (3): 447-459.

31. Camele, I., Altieri, L., De Martino, L., De Feo, V., Mancini E., Rana, G.L., 2012. In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by fome plant essential oil components. International Journal of Molecular Sciences, 13: 2290-2300.

32. Cary, J.W., Ehrlich, K.C., Beltz, S.B., Harris-Coward, P., Klich, M.A., 2009. Characterization of the *Aspergillus ochraceoroseus* aflatoxin/sterigmatocystin biosynthetic gene cluster. Mycologia, 101: 352-362.

33. Chang, P-K., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Bennett, J.W., Linz, J.E., Woloshuk, C.P., and Payne, G.A., 1993. Cloning of the *A. parasiticus*

apa-2 gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology, 59: 3273-3279.

34. Christensen, M., Tuthill, D., 1985. Aspergillus: an overview, pp. 195-209. *In:* Advances in Penicillium and Aspergillus systematics. (Eds: R.A. Samson, J.I. Pitt). Plenum Press, New York.

35. Colak, H., Bingol, E.B., Hampikyan, H., Nazli, B., 2006. Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. Journal of Food and Drug Analysis, 14 (3): 292-296.

36. Del Fiore, A., Reverberi, M., De Rossi, P., Tolaini, V., Fabbri, A.A., Fanelli, C. 2010. Polymerase chain reaction-based assay for the early detection of aflatoxigenic fungi on maize kernels. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2 (1), 22-27.

37. Demiray, E., Tülek, Y., 2012. Kurutma İşleminin Kırmızıbiberdeki Renk Maddelerine Etkisi. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 7 (3): 1-10.

38. Demircioğlu, S., Filazi, A., 2010. Türkiye'de Üretilen Kırmızıbiberlerde Aflatoksin Kalıntılarının Araştırılması. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 81 (2): 63-66

39. Dıraman, H., Arıcı, M., 1999. Tekirdağ ilinde tüketime sunulan kırmızı pul biberlerde aflatoksin aranması üzerine bir çalışma. Gıda, 12: 41-43.

40. Doğantan, Z.S., 1986. Kahramanmaraş Biberinin Kurutmaya Yönelik Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Saptanması ile Doğal Koşullarda ve Plastik Örtüaltı Güneş Toplayıcılarıyla Kurutma Üzerine Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 161 s.

41. Dokuzlu, C., 2001. Kırmızı toz biberlerde aflatoksin. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 20: 19-23.

42. Duman, A.D., 2010. Storage of red chili pepper under hermetically sealed or vacuum conditions for preservation of its quality and prevention of mycotoxin occurrence. Journal of Stored Products Research, 46: 155-160.

43. Duman, A.D., 2010. Storage of red chili pepper under hermetically sealed or vacuum conditions for preservation of its quality and prevention of mycotoxin occurrence. Journal of Stored Products Research, 46: 155-160.

44. Duman, A.D., Zorlugenç, B., Evliya, B., 2002. Kahramanmaraş'ta kırmızıbiberin önemi ve sorunları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 5 (1): 111-117.

45. El Mahgubi, A., Puel, O., Bailly, S., Tadrist, S., Querin, A., Ouadia, A., Oswald, I.P., Bailly, J.D., 2013. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. Food Control, 32: 143-148.

46. Erdogan, A., 2004. The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. Chemosphere, 56: 321-325.

47. Ermiş, Ö.C., 1998. Kırmızı Pul Biberlerde Mikroflora ve Aflatoksin Oluşumuna Bölgenin Etkisi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 43 s.

48. Feddern, V., Dors, G.C., Tavernari, F. de C., Mazzuco, H., Cunha Junior, A., Krabbe, E.L., Scheuermann, G.N., 2013. Aflatoxins importance on animal nutrition, pp. 171-195. *In:* Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects (Ed: M. Razzaghi-Abyaneh). http://dx.doi.org/10.5772/51952.

49. Fernández-Cruz, M.L., Mansilla, M.L., Tadeo, J.L., 2010. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications, Journal of Advanced Research, 1: 113-122.

50. Furtado, N.A.J.C., Fonseca, M.J.V., Bastos, J.K., 2005. The potential of an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain to produce antimicrobial secondary metabolites. Brazilian Journal of Microbiology, 36: 357-362.

51. Gallo, A., Epifani, F., Bonsegna, S., Pascale, M., Santino, A., Perrone, G., 2010. Analysis of genes early expressed during *Aspergillus flavus* colonisation of hazelnut. International Journal of Food Microbiology, 137: 111-115.

52. Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., 2009. Physiological and molecular aspects of ochratoxin A biosynthesis. Physiology and Genetics, 15: 353-376.

53. Gibbons, J.G., Rokas, A., 2013. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. Trends in Microbiology, 21 (1): 14-22.

54. Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., Magan, N., 2008. Effect of a_w and CO_2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. International Journal of Food Microbiology, 122: 109-113.

55. Golge, O., Hepsag, F., Kabak, B., 2013. Incidence and level of aflatoxin contamination in chilli commercialised in Turkey. Food Control, 33: 514-520.

56. Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J., Gettinby, G., 1997. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in solid surface culture. Applied and Environmental Microbiology, 63 (3): 1048-1053.

57. Guo, B., Fedorova, N.D., Chen, X., Wan, C-H., Wang, W., Nierman, W.C., Bhatnagar, D., Yu, J., 2011. Gene expression profiling and identification of resistance genes to *Aspergillus flavus* infection in peanut through EST and microarray strategies. Toxins, 3: 737-753.

58. Guo, B., Yu, J., Holbrook, C.C., Cleveland, T.E., Nierman, W.C., Scully, B.T., 2009. Strategies in prevention of preharvest aflatoxin contamination in peanuts: Aflatoxin biosynthesis, genetics and genomics. Peanut Science, 36 (1): 11-20.

59. Guo, H.F., Leonard, T.J., 1998. Culture Conditions Control Expression of the Genes for Aflatoxin and Sterigmatocystin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans.* Applied and Environmental Microbiology, 64 (6): 2275–2277.

60. Gürgün V., Halkman, K., 1990. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No 7, Ankara.

61. Hammami, W., Fiori, S., Thani, R.A., Kali, N.A., Balmas, V., Migheli, Q., Jaoua, S., 2014. Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. Food Control, 37: 177-181.

62. Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., Denning, D.W., 2007. *Aspergillus flavus*: Human pathogen, allergen and mycotoxin poducer. Microbiology, 153: 1677-1692.

63. Hendrickse, R.G., 1997. Of sick turkeys, kwashiorkor, malaria, perinatal mortality, heroin addicts and food poisoning: research on the influence of aflatoxins on child health in the tropics. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 91 (7): 787-793.

64. Hines, W.W., Montgomery, D.C., 1990. Probability and Statistics in Engineering and Management Science. 3. Baskı, John Wiley & Sons, New York.

65. Hussain, I., 2011. Aflatoxin measurement and analysis, pp. 129-146. *In:* Aflatoxins-Detection, Measurement and Control. (Ed: I. Torres-Pacheco). InTech, China. (Online Erişim: http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-detection-measurement-and-control/aflatoxin-measurement-and-analysis1)

66. Hussein, H.S., Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 167: 101-134.

67. Iheanacho, H.E., Dutton, M.F., Steenkamp, P.A., Steenkamp, L., Makun, H.A., Swart, A., Mthombeni, J.Q., 2014. Real time PCR of *Nor~1* (*aflD*) gene of aflatoxin producing fungi and its correlative quantization to aflatoxin levels in South African compound feeds. Journal of Microbiological Methods, 97: 63-67.

68. Iqbal, S.Z., Asi, M.R., Zuber, M., Akhtar, J., Saif, M.J., 2013. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial chilli and chilli sauce samples. Food Control, 30: 621-625.

69. Iqbal, S.Z., Paterson, R.R.M., Bhatti, I.A., Asi, M.R., 2011. Aflatoxin concentration in chilies vary depending on variety. Mycoscience, 52: 296-299.

70. Jalili, M., Jinap, S., 2012. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili. Food Control, 24: 160-164.

71. Jamali, M., Karimipour, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Amani, A., Razzaghi-Abyaneh, M., 2013. Expression of aflatoxin genes *aflO* (*omtB*) and *aflQ* (*ordA*) differentiates levels of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains from soils of pistachio orchards, Research in Microbiology, 164: 293-299.

72. Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C., González-Jaéna, M.T., 2010. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. Food Microbiology, 27 (1): 50-57.

73. Kachholz, T., Demain, A.L., 1983. Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. Journal of Natural Products, 46: 499-506.

74. Kadakal, Ç., Poyrazoğlu, E., Yemiş, O., Artık, N., 2001. Kırmızıbiberlerde acılık ve renk bileşenleri. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 7 (3): 359-366.

75. Kale, S.P., Bennett, J.W., 1992. Strain instability in filamentous fungi, pp. 311-331. *In*: Handbook of Applied Mycology Volume 5: Mycotoxins in Ecological Systems (Eds: D. Bhatnagar, E.B. Lillehoj, D.K. Arora). Marcel Dekker, New York.

76. Kanbur, M., Liman, B.C., Eraslan, G., Altınordulu, Ş., 2006. Kayseri'de tüketime sunulan kırmızı biberlerde aflatoksin B_1'in Enzim İmmunoassay (EIA) ile

kantitatif analizi. Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 3 (1): 21-24.

77. Klich M., 1998. Soil fungi of some low-altitude desert cotton fields and ability of their extracts to inhibit *Aspergillus flavus*. Mycopathologia, 142: 97-100.

78. Kozakiewicz, K., Smith, D., 1994. Physiology of *Aspergillus*, pp. 23-41. *In:* Aspergillus Biotechnology Handbooks. (Ed: J.E. Smith). Plenum Press, New York.

79. Kraikruan, W., Sangchote, S., Sukprakarn, S., 2008. Effect of capsaicin on germination of Colletotrichum capsici conidia. Kasetsart Journal (Natural Science), 42: 417-422.

80. Kumar, V., Basu, M.S., Rajendran, T.P., 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. Crop Protection, 27: 891-905.

81. Li, P., Zhang, Q., Zhang, D., Guan, D., Ding, X, Liu, X., Fang, S., Wang, X., Zhang, W., 2011. Aflatoxin measurement and analysis, pp. 183-208. *In:* Aflatoxins-Detection, Measurement and Control. (Ed: I. Torres-Pacheco). InTech, China.

82. Lizárraga-Paulín, E.G., Moreno-Martínez, E., Miranda-Castro, S.P., 2011. Aflatoxins and their impact on human and animal health: An emerging problem, pp. 255-282. *In:* Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology. (Ed: R.G. Guevara-Gonzalez). InTech, China.

83. Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10 (3): 190-212.

84. Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D., 2003. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. European Journal of Plant Pathology, 109: 723-730.

85. Maggon, K.K., Gupta, S.K., Venkitasubramanian, T.A., 1977. Biosynthesis of aflatoxins. Bacteriological Review, 41 (4): 822-855.

86. Manetta, A.C., 2011. Aflatoxins: their measure and analysis, pp. 93-108. *In:* Aflatoxins-Detection, Measurement and Control. (Ed: I. Torres-Pacheco). InTech, China. (Online Erişim: http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-detection-measurement-and-control/aflatoxin-measurement-and-analysis1)

87. Mannon, J., Johnson, E., 1985. Fungi down on the farm. New Scientist. 105: 12-16.

88. Manonmani, H.K., Anand, S., Chandrashekar, A., Rati, E.R., 2005. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR, Process Biochemistry, 40: 2859-2864.

89. Marín, S., Colom, C., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2009. Modelling of growth of aflatoxigenic *A. flavus* isolates from red chilli powder as a function of water availability. International Journal of Food Microbiology, 128: 491-496.

90. Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2012. Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. Food Microbiology, 32: 378-388.

91. Masood, A. , Dogra, J.V.V., Jha, A.K., 2008. The influence of colouring and pungent agents of red chilli (*Capsicum annum*) on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Letters in Applied Microbiology, 18 (4): 184-186.

92. Mayer, Z., Bagnara, A., Färber, P., Geisen, R., 2003. Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. International Journal of Food Microbiology, 82: 143-151.

93. McConnell, I.R., Garner, R.C., 1994. DNA adducts of aflatoxins, sterigmatocystin and other mycotoxins. IARC Scientific Publications, 125: 49-55.

94. Mehan, V., McDonald, D., Haravu, L.J., Jayanthi, S., 1991. The groundnut aflatoxin problem: Review and literature database. (Web sayfası: http://oar.icrisat.org/2413/1/RA00178.pdf), (Erişim tarihi: Ocak 2014).

95. Milani, J.M., 2013. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. Veterinarni Medicina, 58 (8): 405-411.

96. Miller, J.D., 1995. Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. Journal of Stored Product Research, 31 (1): 1-16.

97. Mishra, H.N., Das, C., 2003. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43 (3): 245-264.

98. Molina, M., Giannuzzi, L., 2002. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. Food Research International, 35: 585-594.

99. Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., Radu, S., 2011. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. Journal of Applied Microbiology, 111: 1262-1274.

100. Mulunda, M., Mike, D., 2014. Occurrence of aflatoxin M_1 from rural subsistence and commercial farms from selected areas of South Africa. Food Control, 39: 92-96.

101. Norton, R.A., 1997. Effect of carotenoids on aflatoxins B1 synthesis by Aspergillus flavus. Phytopathology 87, 814-821.

102. Ozbey, F., Kabak, B., 2012. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. Food Control, 28: 354-361.

103. Özkan, M., Cemeroğlu, B., 1997. Karotenoidler: Özellikleri ve gıdalarda uygulamaları. Gıda Teknolojisi, 2 (11): 34-44.

104. Paksoy, M., Uslu, Ö.S., 2006. Türkiye'de kırmızıbiberin pazarlanması ve sorunları. VI. Sebze Tarımı Sempozyumu, (19-20 Eylül 2006, Kahramanmaraş), 335-339.

105. Papa, K.E., 1982. Norsolorinic Acid Mutant of *Aspergillus flavus*. Journal of General Microbiology, 128: 1345-1348.

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

107. Passone, M.A., Rosso, L.C., Ciancio, A., Etcheverry, M., 2010. Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. International Journal of Food Microbiology, 138: 276-281.

108. Payne, G.A., Brown, M.P., 1998. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis, Annual Review of Phytopathology, 36: 329-362.

109. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Ahmed, W., Khan, A.G., 2008. Categorization of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates of stored wheat grains in to aflatoxinogenics and non-aflatoxinogenics. Pakistan Journal of Botany, 40 (5): 2177-2192.

110. Reddy, K.R.N., Salleh, B, Saad, B., Abbas, H.K., Abel, C.A., Shier, W.T., 2010. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. Toxin Reviews, 29 (1): 3-26.

111. Reddy, S.V., Waliyar, F., 2014. Properties of aflatoxin and it producing fungi. (Web sayfası: http://www.icrisat.org/aflatoxin/aflatoxin.asp), (Erişim tarihi: Ocak 2014).

112. Ribeiro, J.M.M., Cavaglieri, L.R., Fraga, M.E., Direito, G.M., Dalcero, A.M., Rosa, C.A.R., 2006. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. Letters in Applied Microbiology, 42 (2): 179-184.

113. Rocha, M.E.B. da, Freire, F. da C.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F., Rondina, D., 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. Food Control, 36 (1): 159-165.

114. Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Martín, A., Córdoba, J.J., 2012a. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods, Food Microbiology, 31: 89-99.

115. Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Nuñez, F., Córdoba, J.J., 2012b. Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. Food Control, 27: 118-126.

116. Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J.M., 2007. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. Food Microbiology, 24: 517-529.

117. Samson, R.A., Varga, J., 2010. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs, pp. 19-40. *In:* Molecular Biology and Genomics. (Eds: M. Mashida, K. Gomi). Caister Academic Press, United Kingdom.

118. Sanchis, V., Magan, N., 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins, pp. 174-189. *In:* Mycotoxins in Food-Detection and Control. (Eds: N. Magan, M. Olsen). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

119. Santos, L., Kasper, R., Sardiñas, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2010. Effect of *Capsicum* carotenoids on growth and aflatoxins production by

Aspergillus flavus isolated from paprika and chilli. Food Microbiology, 27: 1064-1070.

120. Santos, L., Marín, S., Mateo, E.M., Gil-Serna, J., Valle-Algarra, F.M., Patiño, B., Ramos, A.J., 2011. Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in *Capsicum* powder. International Journal of Food Microbiology, 151 (3): 270-276.

121. Santos, L., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2010. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in *Capsicum* powder samples available on the Spanish market. Food Chemistry, 122 (3): 826-830.

122. Sardiñas, N., Gil-Serna, J., Santos, L., Ramos, A.J., González-Jaén, M.T., Patiño, B., Vázquez, C., 2011. Detection of potentially mycotoxigenic *Aspergillus* species in *Capsicum* powder by a highly sensitive PCR-based detection method. Food Control, 22: 1363-1366.

123. Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, M.T. and Patiño, B., 2011. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. International Journal of Food Microbiology, 145 (1): 121-125.

124. Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A., Migheli, Q., 2005. Detection of transcripts of the aflatoxin genes *aflD, aflO*, and *aflP* by reverse transcription-polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. International Journal of Food Microbiology, 98: 201-210.

125. Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N., Geisen, R., 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. International Journal of Food Microbiology, 135: 231-237.

126. Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., 2007. A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. International Journal of Food Microbiology, 117: 131-140.

127. Schmidt-Heydt, M., Magan, N., Geisen, R., 2008. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. FEMS Microbiology Letters, 284: 142-149.

128. Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C.E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., Geisen, R., 2010. The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various

combinations of temperature and water activity is related to the ratio of *aflS* to *aflR* expression. Mycotoxin Research, 28 (4): 241-246.

129. Set, E., Erkmen, O., 2010. The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. Food and Chemical Toxicology, 48: 2532-2537.

130. Singh, T., Chittenden, C., 2008. In-vitro antifungal activity of chilli extracts in combination with *Lactobacillus casei* against common sapstain fungi. Int. Biodeter. Biodegr. 62, 364-367.

131. Soso, V.M., Skrinjar, M.M., Blagojev, N.T., Cabarcapa, I.S., Lukic, D.C., 2013. Antifungal activitiy of oleoresins used in meat industry on some toxigenic *Aspergillus* spp. Journal of Natural Science Matica Srpska Novi Sad., 124: 185-194.

132. Steyn, P.S., Stander, M.A., 1999. Mycotoxins with special reference to the carcinogenic mycotoxins: aflatoxins, ochratoxins and fumonisins, pp. 2145-2177. *In:* General and Applied Toxicology. (Eds: B. Ballantyne, T.C. Marrs, T.L.M. Syversen). MacMillan Reference Ltd, London, United Kingdom.

133. Şeniz, V., 1992. Domates, Biber ve Patlıcan Yetiştiriciliği. Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı Yayınları, No: 26, Yalova, 174 s.

134. Tıraş, M., 2003. Kahramanmaraş merkez ilçede kırmızı biber tarımı, Doğu Coğrafya Dergisi, 8 (10): 67-80.

135. Trail, F., Chang, P-K., Cary, J., Linz, J.E., 1994. Structural and functional analysis of the *nor-1* gene involved in the biosynthesis of aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*. Applied and Environmental Microbiology, 60: 4078-4085.

136. Trail, F., Mahanti, N., Linz, J., 1995. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. Microbiology, 141: 755-765.

137. Tunail, N., 2000. Funguslar ve mikotoksinler, s.116-184. *In:* Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, 2. Baskı. Ankara.

138. TÜİK, 2014. Bitkisel Üretim İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara. (Web sayfası: http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul), (Erişim tarihi: Şubat 2014).

139. TÜİK, 2014. Dış Ticaret İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara. (Web sayfası: http://www.tuik.gov.tr/disticaretapp/menu.zul), (Erişim tarihi: Şubat 2014).

140. Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J., Kozakiewicz, Z., 2003. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. Food Technology and Biotechnology, 41 (1): 29-36.

141. Watanabe, C.M.H., Townsend, C.A., 2002. Initial characterization of a type I fatty acid synthase and polyketide synthase multienzyme complex NorS in the biosynthesis of aflatoxin B_1. Chemistry and Biology, 9: 981-988.

142. Woloshuk, C.P., Cavaletto, J.R., Cleveland, T.E., 1997. Inducers of aflatoxin biosynthesis from colonized maize kernels are generated by an amylase activity from *Aspergillus flavus*. Phytopathology, 87: 164-169.

143. Yalçın, D., 2008. Kırmızı pul biber üretiminde kritik kontrol noktaları ve tehlike analizleri. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 11 (2): 129-137.

144. Yogendrarajah, P., Jacxsens, L., De Saeger, S., De Meulenaer, B., 2014. Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annum* L.) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. Food Control, 46: 26-34.

145. Yu, J., 2012. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. Toxins, 4: 1024-1057.

146. Yu, J., Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C., 2002. Aflatoxin biosynthesis. Revista Iberoamericana de Micologia, 19: 191-200.

147. Yu, J., Chang, P-K., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., 2000. Cloning of sugar utilization gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. Biochimica et Biophysica Acta, 1493: 211-214.

148. Yu, J., Chang, P-K., Cary, J.W., Wright, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A. and Linz, J.E., 1995. Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. Applied and Environmental Microbiology, 61 (6): 2365-2371.

149. Yu, J., Chang, P-K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E. Woloshuk, C.P., Bennett, J.W., 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology, 70 (3): 1253-1262.

150. Yu, J., Cleveland, T.E., Nierman, W.C., Bennett, J.W., 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. Revista Iberoamericana de Micologia, 22: 194-202.

151. Yu, J., Ehrlich, K.C., 2011. Aflatoxin biosynthetic pathway and pathway genes, 42-66. In: Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology (Ed: R.G. Guevara-Gonzalez). InTech, China. (Online Erişim: http://www. intechopen.com/ books/aflatoxins-biochemistry-and-molecularbiology/ aflatoxin-biosynthetic-pathway-and-pathway-genes)

152. Yu, J., Nierman, W.C., Bennett, J.W., Cleveland, T.E., Bhatnagar, D., 2010. Genetics and genomics of *Aspergillus flavus*, pp. 51-74. *In:* Progress in Mycology. (Eds: M. Rai, G. Kövics). Scientific Publishers, India.

153. Yu, J., Payne, G.A., Campbell, B.C., Guo, B., Cleveland, T.E., Robens, J.F., Keller, N.P., Bennett, J.W., Nierman, W.C., 2008. Mycotoxin production and prevention of aflatoxin contamination in food and feed, pp. 457-466. *In:* The Aspergilli: Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods. (Eds: G.H. Goldman, S.A. Osmani). CRC Press, United Kingdom.

154. Zain, M.E., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society, 15: 129-144.

EKLER

EK-1

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde AFPA Besiyerinde *A. flavus* Sayım Sonuçları (kob/g) (1. Tekerrür)

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	162000	162000	162000	162000
	1	215000	230000	250000	230000
	2	320000	345000	395000	350000
	3	430000	475000	168000	230000
	4	340000	210000	105000	112000
	5	230000	165000	60000	77000
	7	130000	82000	4600	40000
	10	64500	13500	3500	14000
	15	43000	5750	1350	1800
	20	24500	3150	685	1000
0.85	0	162000	162000	162000	162000
	1	230000	238000	242000	190000
	2	365000	320000	380000	232000
	3	480000	480000	335000	139000
	4	350000	210000	190000	103000
	5	265000	180000	132000	78000
	7	198000	83000	102000	54000
	10	96000	58000	42000	22000
	15	45500	22000	29000	14000
	20	25500	4350	8900	10000
0.90	0	182000	182000	182000	182000
	1	375000	260000	230000	205000
	2	350000	260000	290000	260000
	3	290000	170000	220000	435000
	4	275000	104000	475000	605000
	5	205000	54000	795000	915000
	7	190000	40000	1080000	940000
	10	85000	24000	1800000	3200000
	15	60000	8100	2600000	9300000
	20	21500	3400	9150000	6300000
0.95	0	182000	182000	182000	182000
	1	420000	410000	410000	255000
	2	385000	365000	540000	300000
	3	340000	350000	530000	610000
	4	320000	320000	1270000	870000
	5	210000	290000	2310000	1300000
	7	110000	220000	2150000	2590000
	10	72000	165000	2380000	3180000
	15	65000	342000	4100000	27000000
	20	32500	475000	16000000	15100000

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde AFPA Besiyerinde *A. flavus* Sayım Sonuçları (kob/g) (2. Tekerrür)

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	112000	112000	112000	112000
	1	122000	128000	140000	130000
	2	140000	135000	88000	122000
	3	95000	105000	71500	88000
	4	92500	101000	57500	42000
	5	77500	62000	52000	25000
	7	70000	60000	21500	13000
	10	64000	22000	5200	9600
	15	36000	9000	800	1400
	20	23500	2700	340	730
0.85	0	112000	112000	112000	112000
	1	130000	145000	168000	150000
	2	148000	155000	182000	200000
	3	100000	115000	80000	142000
	4	85000	101000	60000	141000
	5	87500	66000	47500	51000
	7	80000	55500	72000	58500
	10	62500	54000	31000	35000
	15	50000	19000	19500	21000
	20	33500	2600	9500	7000
0.90	0	130000	130000	130000	130000
	1	240000	180000	240000	260000
	2	280000	190000	330000	340000
	3	160000	220000	360000	380000
	4	85000	160000	380000	540000
	5	57000	120000	640000	680000
	7	39000	100000	740000	1200000
	10	21000	62000	1240000	1640000
	15	20000	36000	2100000	9600000
	20	11500	16000	6630000	7800000
0.95	0	130000	130000	130000	130000
	1	200000	210000	265000	260000
	2	320000	420000	360000	350000
	3	380000	720000	300000	480000
	4	220000	360000	520000	1040000
	5	200000	270000	820000	1260000
	7	440000	590000	1270000	2600000
	10	280000	340000	2700000	5800000
	15	130000	250000	3400000	23500000
	20	54000	120000	14200000	10600000

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde DRBC Besiyerinde *A. flavus* Sayım Sonuçları (kob/g) (1. Tekerrür)

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	182000	182000	182000	182000
	1	230000	240000	245000	282500
	2	325000	355000	390000	365000
	3	445000	485000	200000	210000
	4	370000	230000	112500	150000
	5	280000	150000	62000	90000
	7	150000	87500	5250	53000
	10	82500	14000	4000	27000
	15	53000	6000	800	8400
	20	27000	3600	410	1300
0.85	0	182000	182000	182000	182000
	1	248000	252000	260000	220000
	2	362000	360000	420000	240000
	3	480000	480000	330000	150000
	4	405000	265000	160000	110000
	5	285000	165000	155000	84000
	7	225000	89000	122000	62000
	10	132000	62500	50000	32000
	15	59000	20000	33000	19000
	20	32000	5200	12000	11000
0.90	0	195000	195000	195000	195000
	1	260000	240000	230000	240000
	2	310000	250000	255000	320000
	3	190000	155000	220000	620000
	4	98000	115000	620000	730000
	5	55000	51000	790000	1070000
	7	48000	47000	1210000	1340000
	10	22000	21500	2050000	4000000
	15	18000	8000	3000000	10200000
	20	8500	3000	10200000	7100000
0.95	0	195000	195000	195000	195000
	1	420000	440000	430000	260000
	2	400000	410000	550000	360000
	3	370000	390000	570000	770000
	4	320000	330000	1380000	940000
	5	230000	330000	2600000	1500000
	7	130000	280000	2200000	2330000
	10	90000	202000	2600000	3020000
	15	85000	400000	4500000	14000000
	20	48000	490000	21000000	8900000

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde DRBC Besiyerinde *A. flavus* Sayım Sonuçları (kob/g) (2. Tekerrür)

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	135000	135000	135000	135000
	1	138500	132500	137500	145000
	2	172500	157500	130000	93000
	3	95000	112500	84000	86000
	4	91500	102500	57000	49000
	5	81500	85000	37000	28000
	7	67500	80000	11500	10000
	10	57500	17000	6000	4600
	15	50000	5250	800	2100
	20	25000	2200	180	120
0.85	0	135000	135000	135000	135000
	1	125000	150000	155000	145000
	2	145000	178000	200000	230000
	3	115000	120000	105000	142000
	4	105000	84000	68000	130000
	5	90000	80000	50000	62000
	7	85000	70000	60000	66000
	10	72000	48000	39000	28000
	15	52000	12000	22000	19000
	20	38000	3200	12000	9400
0.90	0	180000	180000	180000	180000
	1	180000	160000	280000	220000
	2	210000	230000	320000	260000
	3	240000	260000	300000	440000
	4	160000	200000	360000	460000
	5	120000	150000	520000	510000
	7	78000	120000	830000	950000
	10	14000	94000	1160000	1420000
	15	11000	28000	4900000	10500000
	20	2000	18000	10500000	8200000
0.95	0	180000	180000	180000	180000
	1	280000	320000	260000	300000
	2	420000	580000	360000	460000
	3	540000	860000	280000	620000
	4	310000	440000	440000	1400000
	5	250000	520000	720000	1820000
	7	350000	240000	1360000	2500000
	10	166000	210000	2500000	16000000
	15	104000	130000	3700000	15600000
	20	76000	110000	13800000	12200000

EK-2

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde AFB_1 Miktarları (ppb) (1. Tekerrür)

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	7,34	7,34	7,34	7,34
	1	7,69	7,30	7,67	8,19
	2	8,08	8,14	8,66	8,47
	3	8,27	8,7	8,79	8,64
	4	8,39	8,75	9,66	8,31
	5	8,68	9,05	8,87	9,78
	7	7,86	8,11	9,77	10,57
	10	7,57	8,01	8,14	9,05
	15	7,11	8,33	8,26	9,87
	20	6,54	7,55	8,06	9,48
0.85	0	7,34	7,34	7,34	7,34
	1	8,14	8,26	8,29	8,06
	2	8,53	8,69	9,25	9,63
	3	9,61	8,97	11,26	10,57
	4	9,42	9,7	10,87	13,12
	5	10,53	10,11	11,55	15,06
	7	10,04	9,16	11,97	15,39
	10	7,25	9,27	9,83	14,26
	15	7,31	9,64	10,00	13,24
	20	6,78	9,14	9,25	12,15
0.90	0	8,34	8,34	8,34	8,34
	1	8,45	8,51	8,26	8,57
	2	9,58	9,94	10,09	11,17
	3	11,79	10,5	13,13	13,28
	4	12,45	11,49	14,66	19,87
	5	12,67	14,56	17,87	22,17
	7	13,12	13,58	20,46	23,04
	10	13,69	12,23	18,57	26,09
	15	11,14	12,25	20,96	28,04
	20	9,39	11,87	21,23	27,11
0.95	0	8,34	8,34	8,34	8,34
	1	8,81	9,01	8,86	8,5
	2	9,33	14,06	10,36	10,79
	3	9,66	20,37	22,61	22,23
	4	12,01	19,19	25,57	27,53
	5	12,75	20,05	27,05	39,92
	7	15,91	23,05	42,18	49,76
	10	14,32	23,01	45,55	53,55
	15	13,13	25,21	54,19	60,58
	20	12,46	22,75	52,39	58,46

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde AFB_1 Miktarları (ppb) (2. Tekerrür)

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	7,86	7,86	7,86	7,86
	1	8,57	7,99	7,99	8,11
	2	9,36	7,42	9,15	9,07
	3	8,87	8,85	9,77	9,67
	4	9,23	9,28	9,84	10,54
	5	9,59	10,44	10,53	11,37
	7	9,98	9,74	11,23	11,85
	10	8,11	9,79	10,23	10,03
	15	7,53	8,17	9,95	9,88
	20	6,32	7,42	10,38	8,23
0.85	0	7,86	7,86	7,86	7,86
	1	8,03	7,96	7,61	7,69
	2	8,92	8,6	12,52	10,3
	3	8,28	9,67	13,01	12,48
	4	9,03	11,61	12,98	14,13
	5	9,85	10,55	12,52	14,96
	7	9,16	10,28	13,5	15,39
	10	9,54	10,76	13,21	12,6
	15	8,25	10,15	12,25	11,25
	20	7,65	9,71	11,5	9,77
0.90	0	7,49	7,49	7,49	7,49
	1	8,12	9,45	8,69	8,71
	2	8,95	10,36	10,17	10,19
	3	10,24	12,23	13,37	14,51
	4	9,13	11,26	14,31	15,22
	5	11,76	15,13	17,47	18,36
	7	10,45	13,87	20,57	20,59
	10	8,63	12,67	19,31	25,64
	15	9,39	12,56	19,54	29,64
	20	9,14	13,79	21,31	25,88
0.95	0	7,49	7,49	7,49	7,49
	1	8,11	8,78	8,69	8,35
	2	10,23	13,14	9,71	10,13
	3	11,67	10,58	15,69	17,39
	4	10,58	16,21	23,46	23,4
	5	13,86	19,29	27,59	37,27
	7	14,57	17,72	38,41	55,63
	10	12,45	17,62	41,74	60,25
	15	14,17	16,68	60,22	62,53
	20	10,58	16,25	56,98	57,64

EK-3

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde *AflR* Logaritmik Gen Kopya Sayıları (1. Tekerrür)

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	2,27	2,27	2,27	2,27
	1	2,41	2,46	2,74	2,55
	2	2,62	2,26	3,03	2,9
	3	2,8	2,18	3,15	2,79
	4	2,45	2,01	3,19	3,03
	5	2,34	2,34	3,11	2,62
	7	2,2	2,65	2,93	2,28
	10	2,6	2,22	2,62	2,12
	15	2,34	2,34	2,34	2,57
	20	2,16	2,11	2,79	2,74
0.85	0	2,27	2,27	2,27	2,27
	1	2,02	2,13	2,64	2,68
	2	2,51	2,88	2,96	2,75
	3	2,66	3,39	2,66	2,94
	4	3,07	3,24	3,39	2,49
	5	2,56	2,94	3,33	2,88
	7	2,65	3,15	3,12	2,57
	10	2,71	2,58	2,84	2,21
	15	2,59	2,27	2,58	2,01
	20	1,87	1,83	2,19	2,15
0.90	0	2,32	2,32	2,32	2,32
	1	2,43	2,51	2,70	2,25
	2	2,42	2,7	2,59	2,17
	3	2,33	2,8	2,61	2,59
	4	2,55	2,6	3,26	3,64
	5	2,06	2,46	3,46	3,32
	7	2,06	2,51	2,67	3,07
	10	1,57	2,05	2,78	2,38
	15	1,61	2,5	2,85	2,68
	20	1,38	2,05	2,89	2,38
0.95	0	2,32	2,32	2,32	2,32
	1	2,08	2,48	2,65	2,12
	2	2,06	2,59	2,97	2,55
	3	1,75	2,35	3,38	2,68
	4	2,01	2,31	3,2	2,75
	5	2,26	2,78	3,41	3,13
	7	2,27	2,22	2,60	3,01
	10	1,93	2,4	2,95	2,62
	15	1,78	2,44	2,72	2,16
	20	1,51	1,96	2,67	1,93

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde *AflR* Logaritmik Gen Kopya Sayıları (2. Tekerrür)

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	2,39	2,39	2,39	2,39
	1	2,54	2,52	2,85	2,72
	2	2,76	2,37	3,39	3,07
	3	2,81	2,29	3,6	2,9
	4	2,59	2,24	3,46	3,35
	5	2,46	2,57	3,17	3,15
	7	2,3	2,91	3,06	3,01
	10	2,67	2,59	2,69	2,41
	15	2,49	2,63	2,44	2,67
	20	2,24	2,22	2,91	2,91
0.85	0	2,39	2,39	2,39	2,39
	1	2,84	2,95	2,95	3,00
	2	2,97	3,25	3,02	3,05
	3	3,08	3,41	3,16	3,55
	4	3,30	3,28	3,65	3,36
	5	2,98	3,24	3,57	3,25
	7	3,15	3,27	3,49	2,98
	10	3,20	2,98	3,30	2,68
	15	3,00	2,75	2,99	2,52
	20	2,49	2,52	2,64	2,68
0.90	0	2,57	2,57	2,57	2,57
	1	3,21	3,38	2,86	2,67
	2	3,07	3,32	2,83	3,01
	3	2,86	3,33	3,63	3,80
	4	2,74	2,95	3,27	3,72
	5	2,68	3,1	3,82	3,69
	7	2,85	3,08	3,42	3,15
	10	2,65	2,77	3,14	2,79
	15	2,29	2,77	3,51	3,19
	20	1,87	2,69	3,69	2,86
0.95	0	2,57	2,57	2,57	2,57
	1	2,44	2,78	2,78	2,29
	2	2,41	2,99	3,09	2,90
	3	2,35	2,7	3,37	3,10
	4	2,4	2,56	3,76	3,68
	5	2,61	2,97	3,57	3,58
	7	2,47	2,55	3,9	3,28
	10	2,51	2,63	3,3	2,93
	15	2,14	3,08	3,38	2,39
	20	1,55	2,66	3,01	2,20

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde
***Nor-1* Logaritmik Gen Kopya Sayıları (1. Tekerrür)**

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	1,84	1,84	1,84	1,84
	1	1,66	1,79	1,82	1,95
	2	1,98	2,13	2,17	2,47
	3	2,25	2,54	2,39	2,48
	4	2,56	2,71	2,80	2,49
	5	2,26	2,53	2,66	2,52
	7	2,19	2,47	2,55	2,32
	10	1,93	2,33	2,30	2,29
	15	1,91	2,16	2,41	2,29
	20	1,80	1,97	2,22	2,60
0.85	0	1,84	1,84	1,84	1,84
	1	1,85	1,90	2,15	1,95
	2	2,18	2,10	2,40	2,51
	3	2,36	2,44	2,79	2,75
	4	2,55	2,41	2,73	2,82
	5	2,45	3,01	3,30	3,43
	7	2,44	2,76	3,11	3,79
	10	2,49	2,64	3,35	4,18
	15	2,26	2,51	3,90	4,74
	20	2,05	2,24	4,51	4,50
0.90	0	1,87	1,87	1,87	1,87
	1	1,59	2,00	1,62	1,79
	2	1,56	2,01	1,77	1,74
	3	1,25	2,24	2,16	2,09
	4	2,41	3,15	4,16	3,94
	5	2,6	3,05	4,58	4,27
	7	1,79	3,65	4,08	3,84
	10	1,21	2,77	4,39	3,99
	15	1,28	2,17	4,99	4,02
	20	0,45	1,97	4,48	4,39
0.95	0	1,87	1,87	1,87	1,87
	1	1,84	1,77	1,89	1,9
	2	2,3	2,22	3,08	2,63
	3	2,07	2,12	3,85	3,36
	4	2,15	2,63	4,25	3,66
	5	2,32	2,71	4,48	3,81
	7	2,76	3,37	4,44	4,07
	10	2,83	3,72	4,12	3,72
	15	3,23	3,35	3,70	3,94
	20	2,75	3,14	3,52	3,93

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde
***Nor-1* Logaritmik Gen Kopya Sayıları (2. Tekerrür)**

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	1,97	1,97	1,97	1,97
	1	1,96	2,06	2,03	1,98
	2	2,37	2,35	2,33	2,53
	3	2,32	2,73	2,62	2,71
	4	2,83	3,03	3,44	2,86
	5	2,39	2,71	3,2	3,09
	7	2,28	2,53	2,96	2,94
	10	2,01	2,33	2,71	2,63
	15	2,01	2,21	2,57	2,51
	20	1,97	2,07	2,26	2,68
0.85	0	1,97	1,97	1,97	1,97
	1	2,09	2,53	2,9	2,53
	2	2,36	2,64	2,77	2,76
	3	2,47	2,68	2,87	2,87
	4	2,78	2,8	3,01	3,29
	5	2,74	3,07	3,53	3,49
	7	2,56	3,29	3,56	3,81
	10	2,62	3,23	3,52	4,48
	15	2,67	2,91	4,00	4,82
	20	2,46	2,55	4,60	4,76
0.90	0	1,89	1,89	1,89	1,89
	1	2,15	2,12	1,83	1,93
	2	1,71	2,3	2,08	2,09
	3	1,83	2,58	2,36	2,85
	4	3,1	3,45	4,48	4,33
	5	3,39	4,32	4,68	4,53
	7	2,82	4,19	4,32	4,31
	10	1,96	4,15	4,69	4,21
	15	1,42	2,61	5,14	4,21
	20	1,14	2,19	4,74	4,48
0.95	0	1,89	1,89	1,89	1,89
	1	1,89	2,24	1,95	1,97
	2	2,31	2,46	3,38	2,75
	3	2,73	2,93	4,25	3,54
	4	2,21	2,72	4,42	3,82
	5	2,56	3,12	4,53	3,88
	7	3,48	3,66	4,68	3,94
	10	3,57	3,76	4,36	4,04
	15	3,65	3,87	4,06	4,16
	20	3,22	3,50	3,84	4,39

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde *PksA* Logaritmik Gen Kopya Sayıları (1. Tekerrür)

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	1,94	1,94	1,94	1,94
	1	2,05	2,03	2,10	2,19
	2	1,78	2,08	2,22	2,27
	3	2,01	2,14	2,69	2,62
	4	2,14	2,18	2,71	2,86
	5	1,70	1,95	2,32	2,57
	7	1,48	1,89	2,08	2,74
	10	1,37	1,72	1,89	2,61
	15	1,20	1,77	1,69	2,49
	20	1,12	1,67	1,64	2,51
0.85	0	1,94	1,94	1,94	1,94
	1	1,95	1,98	2,04	2,46
	2	1,85	2,14	2,69	3,05
	3	2,12	2,61	3,02	3,14
	4	2,14	3,05	3,44	3,07
	5	2,64	3,24	3,65	3,86
	7	2,28	3,56	3,82	3,64
	10	1,99	3,11	4,41	4,03
	15	1,65	2,29	4,14	3,89
	20	1,61	1,66	4,07	3,63
0.90	0	1,99	1,99	1,99	1,99
	1	2,10	2,26	2,36	3,01
	2	1,94	1,99	3,55	3,34
	3	2,49	3,09	4,54	3,94
	4	2,93	2,90	4,70	4,13
	5	2,98	3,36	4,36	3,69
	7	2,73	3,13	4,64	4,21
	10	3,09	4,31	5,08	4,54
	15	2,32	3,87	5,07	4,79
	20	1,88	3,92	5,31	4,89
0.95	0	1,99	1,99	1,99	1,99
	1	1,93	1,93	2,66	2,90
	2	2,15	2,59	3,04	2,53
	3	2,69	2,79	4,19	3,37
	4	2,76	3,00	4,05	3,47
	5	2,83	2,69	4,22	3,74
	7	2,53	3,47	4,30	4,18
	10	2,14	3,59	4,29	4,16
	15	2,04	3,71	4,35	4,16
	20	1,81	3,56	4,53	4,42

Kontamine Kırmızıbiber Numunelerinin Depolama Sürecinde *PksA* Logaritmik Gen Kopya Sayıları (2. Tekerrür)

Su Aktivitesi (a_w)	Zaman (Gün)	İnkübasyon Sıcaklığı			
		5°C	15°C	25°C	35°C
0.80	0	2,15	2,15	2,15	2,15
	1	2,13	2,11	2,21	2,41
	2	1,86	2,22	2,16	2,45
	3	2,21	2,19	2,51	2,88
	4	2,22	2,31	2,54	2,98
	5	1,40	2,01	2,33	2,76
	7	1,32	2,09	2,26	2,51
	10	0,90	1,91	1,95	2,37
	15	0,83	1,75	1,85	2,14
	20	1,00	1,65	1,72	2,20
0.85	0	2,15	2,15	2,15	2,15
	1	2,07	2,13	2,21	2,72
	2	2,09	2,23	2,56	2,99
	3	2,26	2,43	2,83	2,95
	4	2,33	3,21	3,04	2,92
	5	2,89	3,28	3,52	3,66
	7	2,52	3,28	4,02	3,65
	10	1,86	3,02	4,14	3,22
	15	1,74	2,11	4,37	3,58
	20	1,48	1,78	4,52	3,71
0.90	0	2,11	2,11	2,11	2,11
	1	2,21	2,16	2,18	2,49
	2	2,03	2,31	3,30	2,83
	3	2,15	2,75	4,80	4,46
	4	2,55	3,58	4,81	4,21
	5	2,54	3,46	4,57	3,92
	7	2,73	2,99	4,70	4,32
	10	2,38	3,69	4,76	4,24
	15	1,50	4,11	5,02	4,70
	20	1,08	4,38	5,29	4,62
0.95	0	2,11	2,11	2,11	2,11
	1	2,19	2,23	2,69	3,12
	2	2,44	2,81	3,56	3,16
	3	2,93	3,03	4,20	3,79
	4	3,04	3,23	4,35	3,67
	5	3,09	3,10	4,32	4,01
	7	2,80	3,70	4,44	3,95
	10	2,33	3,93	4,36	4,04
	15	2,18	3,73	4,23	4,11
	20	1,98	3,69	4,41	4,32

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Nurdan YAPAR
Uyruğu : Türkiye (TC)
Doğum Yeri ve Tarihi : Kırıkkale, 1968

İletişim Adresi:

Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü
38050 Melikgazi/ KAYSERİ
E-posta: nurdanyapar@yahoo.com; nurdan.yapar@gthb.gov.tr
İş Tel: 0 352 336 24 86

Öğrenim Durumu:

Doktora: Erciyes Ün. Mühendislik Fak. Gıda Mühendisliği Böl. (2009- …)
Yüksek Lisans: Erciyes Ün. Mühendislik Fak. Gıda Mühendisliği Böl. (2006-2008)
Lisans: Hacettepe Ün. Mühendislik Fak. Gıda Mühendisliği Bölümü (1986-1991)

İş Deneyimi:

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Kayseri Gıda Kontrol Lab. Müd.-Mühendis (17.12.2002- ...)
Türkiye Akreditasyon Kurumu - Teknik Uzman (09.01.2007- …)
Türk Standartları Enstitüsü - Teknik Uzman (10.06.2004- …)
Gülsan Gıda San. Ve Tic. A.Ş. - Üretim Müdürü (15.06.1992-15.06.2002)
Nalbantoğlu Gıda A.Ş. Reha Şekerleme - Üretim Sorumlusu (10.07.1991-05.06.1992)