

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



SİRKEDE PENİCİLLİUM EXPANSUM KÜFÜNÜN
İNAKTİVASYONU VE PATULİN DEGRADASYONUNDA
LEUCONOSTOC MESENTEROİDES ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep ÇETİN

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı

OCAK, 2024

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



SİRKEDE PENİCİLLİUM EXPANSUM KÜFÜNÜN
İNAKTİVASYONU VE PATULİN DEGRADASYONUNDA
LEUCONOSTOC MESENTEROİDES ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep ÇETİN
(Y2113.040008)

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zeynep Dilek HEPERKAN

OCAK, 2024

ONAY FORMU

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Sirkede Penicillium Expansum Küfünün İnaktivasyonu Ve Patulin Degradasyonunda Leuconostoc Mesenteroides Etkinliğinin İncelenmesi” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadarki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin kaynakça’da gösterilenlerden olduğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. (.../.../2024)

Zeynep ÇETİN

ÖNSÖZ

“Sirkede Penicillium Expansum Küfünün İnaktivasyonu Ve Patulin Degradasyonunda Leuconostoc Mesenteroides Etkinliğinin İncelenmesi” adlı tez çalışmamız İstanbul Aydın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümünde yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca altı yıl desteğini ve bilgilerini benden esirgemeyen, çalışmamın gerçekleştirilmesi sırasında her sorumu büyük bir sabırla ve güler yüzle karşılayıp bu zorlu süreçte yardımlarıyla bana yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Dilek HEPERKAN’a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarımda tecrübeleriyle bana destek olan ve bu süreçte beni yalnız bırakmayan Arş. Gör. Hatice Sena OLCAI, Arş. Gör. Tuğçe CEYHAN ve laborant Habibe ÇAKIR DÜZGÜN’e teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca maddi, manevi benden desteklerini esirgemeyen ve bana her zaman güvenen, haklarını ödeyemeyeceğim canım annem Aysin ÇETİN ve canım babam Serdar ÇETİN’e minnetlerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak lisansüstü eğitimime başlamamda bana yol gösteren, bu süreçte beni her zaman destekleyen, maddi manevi her şekilde yanımda olan, bana güvenen ve benimle gurur duyduğunu her zaman hissettiren kıymetli dedem Tayfur ÇETİN’e minnet ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu zor süreci daha güzel hale getiren ve hep yanımda olan büyük aileme, arkadaşlarıma, tüm kahrımı çeken sevdiklerime teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2024

Zeynep ÇETİN

SİRKEDE PENİCİLLİUM EXPANSUM KÜFÜNÜN İNAKTİVASYONU VE PATULİN DEGRADASYONUNDA LEUCONOSTOC MESENTEROİDES ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Sirke, gıda sektöründe oldukça yaygın bir kullanım alanına sahip içeriği zengin fermente bir üründür. Son yıllarda ev yapımı sirkeye talep artmış, yanlış uygulamalar sonucu bazı mikotoksinlerin varlığına rastlanmıştır. Bu mikotoksinler gıdayı toksik hale getirdiğinden bu toksik maddeleri parçalamak ve bunları üreten mantarları kontrol etmek için kullanılan umut verici yöntemler geliştirilmektedir. Biyolojik enzimler, kimyasal fungusitler veya laktik asit bakterisi (LAB) ile aşılama uygulamaları ya da fiziksel uygulamalar (UV ışınlama, ozon) kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, daha çok çürük, bozulmuş elmalarda bulunan ve ev yapımı sirkelerde de gelişim gösteren *Penicillium expansum* isimli küfe ve bu küfün ürettiği mikotoksin patuline (PAT) odaklanılmıştır. Sirkedeki mantarın ve mikotoksin PAT'ın engellenmesi için biyolojik detoksifikasyon uygulanarak (LAB) aşılama uygulaması kullanılmıştır. *P. expansum* isimli küften PAT gelişimi izlenmiş ve bakteri desteği ile bu küfün engellenmesi amaçlanmıştır.

Toplam 17 kavanoz elma sirkesi üretilmiş ve laktik asit bakterisinin bulunduğu sirkelerde *P. expansum* mantarının ve buna bağlı olarak baskılanması öngörülmüştür. Patulin analize tabi tutulan aerobik ortamdaki küf enjekte edilen sirkelerde ham değerler sırası ile 7.gün ve 15.gün için 2567,55 µg/L ve 4493,13 µg/L olarak bulunmuştur. LAB takviyesi yapılan aerobik sirkelerde ise PAT tespit edilememiştir. Anaerobik ortamda muhafaza edilen sirkelerde PAT gelişmesine rastlanmamıştır. Laktik asit bakterisi *Leuconostoc mesenteroides* bakterisinin antifungal etkisi kanıtlanmış olup mikotoksinlerin detoksifikasyonun biyolojik detoksifikasyon yöntemlerinin kullanılabileceği kanıtlanmıştır.

Aynı zamanda bu sirkelerin 0. günden itibaren 7,15 ve 30. günlerinden numuneler alınarak mikrobiyolojik, fiziksel, kimyasal özellikleri incelenmiş,

mikrobiyolojik analiz olarak sirkeler numune alınan günlerde MRS/PDA/YGC besiyerlerine ekilmiş ve küf ve bakteri gelişimi izlenmiştir. Brix, toplam asitlik, pH, toplam fenolik madde, antioksidan analizleri yapıp, farklılıklar karşılaştırılıp değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sirke, Patulin, Penicillium expansum, Leuconostoc mesenteroides

INACTIVATION OF PENICILLIUM EXPANSUM MOLD IN VINEGAR AND INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF LEUCONOSTOC MESENTEROIDES IN PATULIN DEGRADATION

ABSTRACT

Vinegar is a fermented product rich in content that is frequently used in the food industry. Demand for homemade vinegar has increased in recent years, the presence of some mycotoxins has been found as a result of incorrect applications. Because these carcinogenic substances make food toxic, promising methods are being developed to break down these toxic substances and control the fungi that produce these mycotoxins. Inoculation applications with biological enzymes, chemical fungicides or lactic acid bacteria (LAB), or physical applications (UV irradiation, ozone) are used.

In this thesis, we focus on the mold called *Penicillium expansum*, which is mostly found on rotten and spoiled apples and also grows in homemade vinegars, and the mycotoxin (PAT) produced by this mold. LAB inoculation application with biological detoxification method was used to prevent the fungus and mycotoxin patulin in vinegar. PAT development from the mold *Penicillium expansum* was monitored and it was aimed to prevent this mold with bacterial support.

A total of 17 jars of apple cider vinegar were produced and it was envisaged to suppress the *P. expansum* fungus and the resulting fungus in the vinegars containing lactic acid bacteria. Raw values in 9 apple cider vinegars subjected to PAT analysis were 2567.55 $\mu\text{g/L}$ and 4493.13 $\mu\text{g/L}$ for 7th day SK(AE) and 15th day SK(AE), respectively, the recovery results were found to be 3473.89 $\mu\text{g/L}$ and 6079.29 $\mu\text{g/L}$. Patulin was not found in vinegar samples to which lactic acid bacteria was added. The antifungal effect of the lactic acid bacterium *Leuconostoc mesenteroides* has been proven and it has been proven that biological detoxification methods can be used to detoxify mycotoxins.

At the same time, microbiological, physical and chemical properties of these vinegars were examined by taking samples from ZZday 0 to days 7, 15 and 30. As a microbiological analysis, the vinegars were planted in MRS/PDA/YGC media on the days the samples were taken and the growth of mold and bacteria was monitored. Additionally, vinegars were subjected to acetic acid bacteria analysis. Brix, total acidity, pH, total phenolic substance and antioxidant analyzes were performed and the differences were compared and evaluated.

Keywords: Vinegar, Patulin, *Penicillium expansum*, *Leuconostoc mesenteroides*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONUR SÖZÜ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
I. GİRİŞ	1
A. Sirke.....	1
B. Sirke Fermentasyonu	2
1. Sirke Üretimi.....	3
a. Yavaş yöntem	3
b. Çabuk yöntem (jeneratör yöntemi).....	3
c. Derin kültür yöntemi (submers) yöntemi	4
2. Sirke Bileşenleri, Kalitesi ve Sağlığa Etkileri.....	4
C. Küfler ve Mikotoksinler	6
1. <i>Penicillium expansum</i>	9
2. Patulin	11
a. Patulin Yapısı ve Özellikleri.....	11
b. Patulinin Sağlık Üzerinde Etkileri.....	12
c. Patulinin Bulunduğu Gıdalar	13

d. Patulin ile İlgili Yasal Düzenlemeler	14
D. Mikotoksin Engellenmesinde Kullanılan Yöntemler	15
1. Fiziksel Yöntemler	16
2. Kimyasal Yöntemler	18
3. Biyolojik Yöntemler	20
E. Laktik Asit Bakterileri ve Genel Özellikleri	23
1. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	24
II. MATERYAL VE METOT	26
A. Materyal	26
1. Kullanılan Malzemeler	26
2. Kullanılan Kimyasallar	27
B. Yöntem	27
C. Metot	28
1. Patulin Detoksifikasyonunda Kullanılacak Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu	28
2. Elma Örneklerinden Küf İzolasyonu	28
3. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 'in <i>Penicillium expansum</i> Üzerinde Antifungal Etkisinin Belirlenmesi	30
4. Sirke Üretimi	31
5. Mikrobiyolojik Analizler	33
6. Kimyasal Analizler	33
7. pH Analizi	34
8. Suda Kuru Madde Analizi (Briks)	34
9. Toplam Asitlik Tayini	34
10. Toplam Fenol İçeriği	35
11. Toplam Flavonoid Miktarı	36
12. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Antioksidan Madde Miktarı Tayini	36

13. Toplam Kuru Madde Analizi	37
14. Patulin Miktarı.....	37
15. Toplam Alkol Miktarı	38
D. İstatistiksel Analiz	38
III. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	39
A. Sirke örneklerinin kısaltma açıklamaları	39
B. Sirke Örneklerinin Günlere Göre pH Değerleri.....	39
C. Sirke Örneklerinin Toplam Asitlik Değerleri	41
D. Sirke Örneklerinin Suda Kuru Madde (Briks) Değerleri.....	44
E. Sirke Örneklerinin Antioksidan Analiz Değerleri	45
F. Sirke Örneklerinin Toplam Fenolik Madde Değerleri.....	47
G. Sirke Örneklerinin Flavonoid Analizi Sonuçları	50
H. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 'in <i>Penicillium expansum</i> Üzerinde Antifungal Etkisinin Belirlenmesi	52
İ. Sirke Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizleri	53
J. Sirke Örneklerinin Toplam Kuru Madde Miktarı.....	60
K. Sirke Örneklerinin Alkol Analizi.....	61
L. Sirke Örneklerinin Patulin Analiz Sonuçları	62
IV. SONUÇ.....	67
V. KAYNAKÇA	69
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1. Bazı mikotoksinler ve fizyolojik etkileri (Roseanu ve ark. 2010)	8
Çizelge 2. Sirke örneklerinin kısaltmaları	39
Çizelge 3. Sirke örneklerinin günlere göre pH değerleri.....	40
Çizelge 4. Sirke örneklerinin günlere göre toplam % asitlik değerleri.	41
Çizelge 5. Sirke örneklerinin günlere göre briks değerleri.....	44
Çizelge 6. Aerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük antioksidan değerleri. 46	
Çizelge 7. Anaerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük antioksidan değerleri.....	46
Çizelge 8. Aerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük fermentasyon sırasında fenolik madde değerleri.....	48
Çizelge 9. Anaerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük fermentasyon sırasında fenolik madde değerleri	48
Çizelge 10. Aerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük flavonoid analiz değerleri.....	51
Çizelge 11. Anaerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük flavonoid madde değerleri.....	51
Çizelge 12. Aerobik sirkelerin depolama sırasındaki MRS toplam bakteri sayıları (log KOB/mL)... ..	54
Çizelge 13. Anaerobik sirkelerin depolama sırasındaki MRS toplam bakteri sayıları (log KOB/mL).....	54
Çizelge 14. Aerobik sirkelerin depolama sırasındaki PDA toplam maya-küf sayıları (log KOB/mL).....	54

Çizelge 15. Anaerobik sirkelerin depolama sırasındaki PDA toplam maya-küf sayıları (log KOB/mL)	54
Çizelge 16. Aerobik ortamdaki sirke örneklerinin kuru madde değerleri	60
Çizelge 17. Anaerobik ortamdaki sirke örneklerinin kuru madde değerleri	60
Çizelge 18. Sirke örneklerinin alkol miktarları	61
Çizelge 19. Sirke örneklerinin patulin ham sonuçları ($\mu\text{g/L}$).....	63

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.	Patulinin kimyasal yapısı (Kadalkal ve Nas, 2000).	11
Şekil 2.	(a-b): <i>Leuconostoc mesenteroides</i> mikroskop görüntüsü (x100'de büyütülmüş)	28
Şekil 3.	PDA üzerinde elma yüzeyinden <i>P. expansum</i> üremesi.....	29
Şekil 4.	PDA üzerinde <i>P. expansum</i> izolasyonu	29
Şekil 5.	<i>Penicillium expansum</i> saflaştırma işlemi	29
Şekil 6.	<i>Penicillium expansum</i> mikroskop görüntüsü	30
Şekil 7.	Sirke üretim aşaması	32
Şekil 8.	17 adet elma sirkesi	32
Şekil 9.	Toplam asitlik titrasyon analizi	35
Şekil 10.	Patulin Kalibrasyon Grafiği	38
Şekil 11.	Aerob sirke örneklerinin pH-Toplam Asitlik Grafiği	43
Şekil 12.	Anaerob sirke örneklerinin pH-Toplam Asitlik Grafiği.....	43
Şekil 13.	(a): 30 günlük fermentasyon sonunda K(ANA), (b): SB(ANA), (c): SK(ANA), (d): SKB(ANA).	44
Şekil 14.	Gallik Asit Kalibrasyon Grafiği ve Denklemi.....	48
Şekil 15.	Quercetin Kalibrasyon Grafiği	51
Şekil 16.	Peptonlu su ortamında <i>Leuconostoc mesenteroides</i> bakterisi varlığında <i>Penicillium expansum</i> küfünün gelişimi	53
Şekil 17.	(a): SK(AE) sirkesinin 0.gün PDA ekim sonucu, (b): SKB(AE) sirkesinin 0.gün PDA ekim sonucu.	56

Şekil 18. (a): SK(AE) sirkesinin 7.gün PDA ekim sonucu, (b): SKB(AE) sirkesinin 7.gün PDA ekim sonucu, (c): SK(ANA) sirkesinin 7.gün PDA ekim sonucu, (d): SKB(ANA) sirkesinin 7.gün PDA ekim sonucu.....	57
Şekil 19. (a): SK(AE) sirkesinin 15.gün PDA ekim sonucu, (b): SKB(AE) sirkesinin 15.gün PDA ekim sonucu, (c): SK(ANA) sirkesinin 15.gün PDA ekim sonucu, (d) SKB(ANA) sirkesinin 15.gün PDA ekim sonucu.....	58
Şekil 20. (a): SK(AE) 30.gün PDA ekim sonucu, (b): SKB(AE) 30.gün PDA ekim sonucu, (c): SK(ANA) 30.gün PDA ekim sonucu, (d): SKB(ANA) 30.gün PDA ekim sonucu. 59	59
Şekil 21. Patulin tespit edilmemiş 0.gün Kontrol sirkesine ait kromatogram.....	63
Şekil 22. Patulin tespit edilmiş olan SK(AE) 7.gün sirke örneğine ait kromatogram	63
Şekil 23. Patulin tespit edilememiş SKB(AE) 7.gün sirke örneğine ait kromatogram	64
Şekil 24. Patulin tespit edilmiş SK(AE) 15.gün sirkesine ait kromatogram	64
Şekil 25. Patulin tespit edilememiş SKB(AE) 15.gün sirkesine ait kromatogram.	64
Şekil 26. Patulin tespit edilememiş SK(ANA) 7.gün sirkesine ait kromatogram ..	65
Şekil 27. Patulin tespit edilememiş SKB(ANA) 7.gün sirkesine ait kromatogram	65
Şekil 28. Patulin tespit edilememiş SK(ANA) 15.gün sirkesine ait kromatogram	65
Şekil 29. Patulin tespit edilememiş SKB(ANA) 15.gün sirkesine ait kromatogram	66

I. GİRİŞ

A. Sirke

Sirke Türk mutfağında zengin besin içeriği ve aromasından dolayı genellikle salatalarda tatlandırıcı olarak veya salamura şeklinde koruyucu olarak kullanılan oldukça fazla kullanım alanına sahip değişik hammaddelerden elde edilebilen fermente bir üründür. Sirke içeriğinin %80'lik kısmını su, diğer %20'lik kısmını ise, organik asitler, alkol, amino asitler ve polifenoller oluşturur (Casale ve ark., 2006). Meyvelerdeki şekerlerin, etanol fermantasyonu sonrası aerobik şartlarda mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*) tarafından oluşturulan etanolün, asetik asit bakterileri (*Acetobacter*, *Gluconobacter* ve *Gluconacetobacter*) tarafından fermantasyonu sonucu oluşan bir berrak bir üründür. Sirke çoğunlukla üretildiği hammaddenin rengini almaktadır (Aybek, 2019). Şarapların asetik asit fermantasyonu sonucunda da sirke oluşmaktadır.

Sirkenin tanımı ülkelere ve o ülkenin mevzuatına göre değişiklik göstermektedir. TSE 1880 EN 13188 sirke standardına göre ise sirke; "Tarım kökenli sıvılar veya diğer maddelerden, iki aşamalı alkol ve asetik asit fermantasyonuyla, biyolojik yolla üretilen kendine özgü ürün" olarak tanımlanmaktadır (Anon., 1952; Anon., 2003b).

Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agricultural Organization, FAO)/Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) sirkeyi "nişasta ve/veya şeker içeren uygun hammaddeden önce alkol, daha sonra asit fermantasyonu olmak üzere iki aşamalı fermantasyon işlemiyle üretilen insan tüketimine uygun sıvı" olarak tanımlamaktadır.

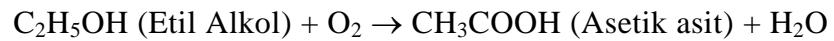
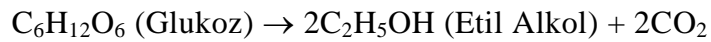
Sirkenin ilk nasıl, kim veya kimler tarafından keşfedildiği ve aktif olarak kullanıldığı kesin olarak bilinmemektedir. Sirke üretiminin tarihi, M.Ö. 3000 yıllarına dayanmaktadır. Zamanında alkollü içkilerin sirkeleşmeleri yani kendi kendilerine asetik asit fermantasyonuna uğramaları gıda kalitesi açısından istenmeyen bir durumdur. Çünkü şarap ve bira gibi fermente içkiler açıkta kendi

hallerine bırakıldığında sıvının yüzeyinde asetik asit bakterileri oluşur. Aynı zamanda sirke mikroflorasındaki diğer mikroorganizmaların (mayalar) oluşturduğu bir zarın (biyofilm, sirke anası) meydana gelmesiyle şarap veya biranın bozulduğu, tadının ve görüntüsünün değiştiği yani sirkeleştiği, görülmüştür. Fakat insanlar, ilerleyen zamanlarda bu olaydan yararlanarak kullanmaya başlayınca bu işlemi inceleyerek öğrenmişlerdir. Sirkeden ilk izole edilen bakteri cinsi *Acetobacter* aynı zamanda ‘sirke bakterisi’ olarak da bilinmektedir. Aynı zamanda bilinen ilk sirke üretimi *Saccharomyces cerevisiae* mayası tarafından fermente edilerek ortaya çıkmıştır. Bulunan eski eserlerden Sümerlerin, Asurluların, Etililerin, İranlıların, eski Mısırlıların ve nihayet eski Yunanlıların da sirke yaptıkları anlaşılmaktadır (Aktan ve Kalkan, 1998).

B. Sirke Fermentasyonu

Asetik asit bakterileri tarafından etil alkolden asetik asit üretimi, aerobik (oksidatif) bir olaydır. Bu durumdan dolayı sirke üretimi mikrobiyolojik açıdan bir fermantasyon olmamasına rağmen, gıda endüstrisinde sirke fermantasyonu olarak adlandırılmaktadır. Saf asetik asitten üretilen sirkelerde ise fermentasyon söz konusu değildir. *Acetobacter* sirke üretiminde endüstride çok daha yaygın olan ve önem taşıyan bir mikroorganizmadır (Ünlütürk ve Turantaş, 2003).

Sirke bakterileri oksijen yardımıyla alkolü okside eder ve asetik aside çevirir. Sirke üretimi sırasında gerçekleşen başlıca reaksiyonlar aşağıda verilmiştir:



Ticari olarak sirke üretiminde genellikle asetik asit bakterileri başlangıç kültürleri olarak kullanılır. Çünkü sirke üretiminde gerçekleşmesi gereken iki tane fermantasyon işlemi vardır. İlki alkol fermantasyonudur. Mayalar anaerobik (oksijensiz) yolla şekerleri etil alkole parçalarlar. Genellikle ilk fermentasyon hızlı ilerler ve birkaç haftada şekerin çoğu parçalanır. Fermente olabilen şekerler, bu aşamadaki alkol fermantasyonuyla birlikte etanole dönüştürülürken, ikinci fermentasyon aşamasındaki *Acetobacter* cinsinin üyeleri olan asetik asit bakterileri şekerleri, şeker alkollerini ve etanolü oksitleyerek asetik asit oluşturan

mezofilik zorunlu aeroblardır. Aerobik şartlarda asetik asit oluşmaktadır (Raspor and Goranovič 2008, Budak et al. 2014). Asetik asit fermentasyonu alkol fermentasyonuna bağlıdır.

Endüstriyel sirke üretiminde asetik asit bakterilerinin kullanımı oldukça yaygındır. Sirke üretimi sırasında genellikle kullanılan mikroorganizma *Acetobacter spp.* dir. Sirke üretimi için *Acetobacter aceti* ve *Acetobacter hansenii* yaygın olarak bilinen ve kullanılan suşlarıdır. Sirke üretimi için gerekli olan oksijen ihtiyacı, optimum sıcaklık aralığı ve reaksiyon süresi değişir (Özkaya ve ark.,1991).

1. Sirke Üretimi

Sirkeler yavaş yöntem (kesikli), hızlı yöntem ve derin kültür (submers) yöntemi olmak üzere başlıca üç yöntemle üretilmektedir (Morales ve ark., 2001; Tan, 2005).

a. Yavaş yöntem

Fıçı gibi ağız açık hava alabilen alkollü sıvı sirkeleşmeye bırakılır. Yavaş yöntemde sirkeleşme diğer yöntemlere göre uzun sürmektedir. Bu yöntem spontan olarak alkol fermentasyonu ile başlar. Alkol fermentasyonu sonucu oluşan etil alkol asetik asit bakterileri ile asetik aside dönüştürülür. Sıvının yüzeyinde bir tabaka oluşur ve sirke anası olarak adlandırılır. Sirkeleşme oldukça yavaş gerçekleşir, bu durum 1.5 -2 ay sürer. 1 m² zar alanı günde 0,5 litre saf alkolü okside eder. Sirkelerin kalitesi açısından yavaş yöntem iyi bir sonuç vermektedir (Ünal, 2007).

b. Çabuk yöntem (jeneratör yöntemi)

Türkiye’de üretimi yapılan sirkelerin bir bölümü bu yöntem ile üretilmektedir. Üç bölmeden oluşan tanklar kullanılarak yöntem gerçekleştirilir. Sirkeleştirme amacıyla alkollü sıvı mikroorganizmanın tutunabileceği yüzeyden damlama suretiyle akıtılır. Asetik asit bakterileri dolgu materyali üzerinde bulunmasından dolayı alkol ile temas edip, fermantasyon sonunda asetik aside dönüştürülür. Alkollü sıvının akış hızı ayarlanır ve gerekli olan hava sirkülasyonu sağlanır (Ünal, 2007; Aktan ve Kalkan, 1998).

c. Derin kültür yöntemi (submers) yöntemi

Derin kültür yönteminde asetik asit bakterileri alkollü sıvıların içinde çalışırlar. Bu yöntemde ürüne sürekli ince hava kabarcıkları verilir ve ürünün yani sirkenin üretildiği kaplara 'asetatör' denir. Çabuk yöntemine göre 30 kez daha hızlı gerçekleşmektedir. Asetatörlerde yapılacak üretimlerde özel bakteri kültürlerinin (*Acetobacter Acetigenum*) kullanılması gerekmektedir. Ticari olarak da en çok tercih edilen yöntemdir. Çünkü ekonomik olmasının yanı sıra üretim süresi açısından da yavaş yöntemine göre daha avantajlı bir sistemdir (Ünal, 2007; Türker, 1963). Derin kültür yöntemiyle üretilen sirkelerin bileşiminde daha yüksek miktarda asetik asit, laktik asit, tartarik asit, malik asit, süksinik asit ve sitrik asit içerdiği tespit edilmiştir (Kırcı, 2017).

Sirke üretim yöntemleri arasında, derin kültür ve çabuk yöntem daha hızlı ve ekonomiktir. Fakat gıda kalitesi göz önüne alındığında yavaş yöntem daha iyi sonuç vermektedir. Üretim sürecinin uzun ve yavaş olması uygun koşullar sağlandığında sirke içeriğini ve kalitesini olumlu yönde etkilemektedir. Çabuk yöntem ve derin kültür yöntemi, üretim maliyetleri ve proses hızı gibi faktörler göz önünde bulundurulduğunda daha avantajlı olmalarından dolayı ticari olarak sirke üretiminde en çok bu yöntemlerin kullanıldığı, küçük çaplı üretimlerde de yavaş yöntemin kullanıldığı kabul edilebilir. Çünkü hızlı yöntemle sirke üretimi yaklaşık 3-7 gün sürer (Morales ve ark., 2001; Tan, 2005).

Geleneksel sirke uzun süreli bir fermantasyonla üretilir ve başlangıç kültürü olarak doğal sirke kullanır. Bu süre yaklaşık 1 ay kadar sürmektedir. Endüstriyel sirke bir gün gibi bir sürede üretilebilir. Geleneksel sirke üretiminde hammadde olarak, üzüm, elma, erik, domates, pirinç ve patates gibi meyve suları kullanılabilir. Asetik asit bakterileri ortamın her yerinde bulunur. Şeker veya alkol içeren gıda maddelerinde veya fermente ürünlerde yayılabilirler (Budak et al. 2014).

2. Sirke Bileşenleri, Kalitesi ve Sağlığa Etkileri

Sirkelerin kalitesini kimyasal bileşimleri belirler. Sirkenin kimyasal bileşiminde asetik asit başta olmak üzere organik asitler, alkoller, fenolik bileşenler ve aminoasitler bulunmaktadır (Casale et al., 2006). Sirkede en bol bulunan mineraller Na, K, Ca ve P olarak kanıtlanmıştır. Ev yapımı sirkeler

antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olmalarından kaynaklı da tercih edilmektedir. Ev yapımı sirkelerin endüstriyel sirkelere göre laktik asit bakterisi, asetik asit bakterisi, maya ve küf yükünün fazla olduğu rapor edilmiştir. Ev ortamında üretilen sirkelerde yanlış uygulamalar sonucu yaşanabilecek kontaminasyonlar sonucu mikrobiyal yoğunluk yaşanabilmektedir (Öztürk vd., 2015). Temizlik veya tarımsal faaliyetler için kullanılan beyaz sirke %20'ye kadar asetik asit içermektedir ve bu sirke insan tüketimi için uygun değildir.

Hammaddenin bileşimi belirli koşullarda değişiklik gösterebilir. Kaliteli hammaddelerden uygu üretilmiş olan sirkelerin kalitesi de iyidir. Bahsedilen farklılıklar hammadde çeşidi, iklim, toprak koşulları gibi faktörlere bağlı olarak oluşur (Prescott ve Dunn, 1959; Gerbi ve ark., 1998; Achaerandio ve ark., 2002; Morales ve ark., 2004).

Sirke hammaddelerinin işlevleri sadece lezzetine ve kalitesine katkıda bulunmakla kalmaz, antibakteriyel ve antioksidan aktivite, kan basıncını düşürme, diyabetin etkilerini azaltma ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisi gibi durumlarda önemli rol oynar. Sirkenin fonksiyonel özellikleri yanında hücre metabolizması regülasyonunun düzenlenmesi, gelişiminin iyileştirilmesinde ve lipit metabolizmasının düzenlenmesi, karaciğer koruması ve kan basıncı ve glikoz kontrolünde etkili olması gibi faydaları olduğu kanıtlanmıştır (Xia vd., 2020; Gomes vd., 2018).

TS 1880 Sirke Standardına göre sirke üretiminde kullanılan hammaddelere göre sirke çeşitleri; şarap sirkesi, meyve sirkesi, meyve şarabı sirkesi, elma şarabı sirkesi, alkol sirkesi, baharatlı sirke (aromalı sirke), tahıl sirkesi, malt sirkesi, bal sirkesi, peynir altı suyu sirkesi ve bira sirkesi olarak verilmiştir (Anonim 2003).

Sirkenin kalitesini belirleyen bir diğer faktör ise üretim yöntemidir (Prescott ve ark., 1959; Morales ve ark., 2004). Sirkeleşmeye etki eden parametreler; sıcaklık, alkol, hava (aerobik-anaerobik ortam farklılığı) ve kullanılan mikroorganizma çeşidi olarak 4 ana başlık altında verilebilir (Türker, 1963).

Sirkenin bir başka kalite kriteri aroma maddeleridir. Aroma maddeleri üretim yöntemi, hammadde ve depolama koşullarına göre değişiklik gösterdiği için kalite ve kusurları arasındaki ayırimda kullanılmıştır (Kadaş, 2011).

Gıdalarda yaşanan bulaşmalar sonucunda oluşan küfler ve bu küflere bağlı olarak ortama salınan mikotoksinler insan sağlığında oldukça risk yaratmaktadır. Sirkeler de bulaşma ve kontaminasyona karşı duyarlı gıda ürünlerinden bir tanesidir. Bulaşmalar genellikle ürünü muhafaza sırasında kontamine eder. Bu yüzden muhafaza koşulları, ortam sıcaklığı gibi şartlar sağlanmalıdır.

C. Küfler ve Mikotoksinler

Günümüzde gelişen teknoloji ile beraber gıda sektöründe kullanım alanı artan kimyasallar nedeni ile insan sağlığı endişe konusu olmaktadır. Küfler, tabiatta çok yaygın olarak bulunan mikroskopik mantarlardır. Glukan ve kitin içeren hücre duvarına sahip, ökaryotik, sporla üreme özelliğine sahip, miselyum oluşturan pamuksu yapıda önemli bir mikroorganizma grubu olarak bilinirler. Birden fazla küf hücresinin yan yana gelmesiyle oluşturdukları yapı “hif” olarak adlandırılır. Bu hif olarak adlandırılan yapıların birbirleri ile dallanarak oluşturdukları hif topluluklarına da “miselyum” denilmektedir. Küfler ve küflere bağlı olarak gelişen mikotoksinler tarım, tıp, gıda, ilaç ve kozmetik endüstrileri gibi birçok alanda kullanımı insan sağlığında risk oluşturmaktadır (Lecellier vd., 2014; Lima ve Santos, 2017)

Özellikle gıda sektöründe küfler gıdanın bozulmasına ve toksin oluşmasına sebep olduğundan dolayı tüketiciler üzerinde önemli bir sağlık sorunudur. Su aktivitesi, sıcaklık, pH, oksijen ve ışık gibi faktörlere bağlı olarak gelişmelerini hızlandırabilirler. Küfler en düşük 0,80 su aktivitesine kadar gelişebilirler ve ortamın nem oranının %10’un altına düştüğü durumlarda ve ortamlarda yaşamsal faaliyet gösteremezler. Geniş sıcaklıklarda (optimum 25-30) canlılıklarını sürdürebilirler. Özellikle düşük sıcaklıklarda gelişmeye yatkın küfler özellikle buzdolabında saklanan gıdalarda faaliyet göstererek gıda bozulmalarına ve zehirlenmelerine sebep olabilirler. Hafif asitli ortamlarda daha aktif gelişme göstermelerinin yanı sıra 1,3-9,6 pH aralıklarında da yaşamlarını sürdürebilirler. Küfler aerob mikroorganizma olduklarından dolayı daha çok yüzeyde gelişme gösterirler. Oksijen ile temaslarının kesilmesi (vakumla ambalaj) üremelerini ve gelişmelerini engellemektedir.

Gıda maddeleri, hammadde üretiminden gıdanın tüketilmesi aşamasına kadar olan hemen hemen her basamakta küfler tarafından kontamine

edilebilmektedir. Gıda güvenliği açısından en önemli küfler *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria spp.*'dir (Bhunja, 2018). Küfler bazı gıdalarda renk ve aroma artırılması amacıyla kullanılırken gıdada istenmeyen renk, tat ve koku bozulmalarına sebep olabilir. Genellikle bozulmuş veya çürümüş elma, ekmek, limon, peynir vb. gibi gıdaların üzerinde küfler sıklıkla gözlenebilir. Bu küfler, ürünlerin bozulmasına sebep olabildiği gibi yüksek sıcaklık gibi belirli çevresel koşullar altında mikotoksin adı verilen toksik özellikte çeşitli sekonder metabolitlerin ortama salınmasına da neden olarak ürünün kalitesini bozabilirler ve zehirlenmelere yol açabilirler (Karaca 2005). Dünya genelinde üretilen gıda, tarımsal ürün ve yemlerin %10'u küfler tarafından canlıların tüketemeyeceği derecede bozulmaya uğratarak kullanılmayacak hale gelerek ziyan olmaktadır (Pitt ve Hocking, 1985; Denizel, 1976).

Mikotoksinler küfler tarafından üretilen genellikle ürünlerde çürüme ve bozulmaya insanlarda zehirlenmeye sebep olan toksik maddelerdir. Bu maddeler insan ve hayvan sağlığı üzerinde güçlü ve çeşitli toksik etkiler oluşturduğundan dolayı küflü gıdaları tüketmek oldukça risklidir (Steyn ve ark., 1999)

Birkaç günden fazla saklanan her gıda küf büyümesi, gelişimi ve mikotoksin oluşumu için bir hedef oluşturmaktadır. Mikotoksin oluşumunda riskli ürünler tahıllar, çerezler, kuru meyveler, kahve, kakao, baharatlar, kuru bakliyatlardır. Mikotoksinler kontamine arpa, tahıl ve üzüm kullanılması nedeniyle bira ve şarapta da bulunabilir.

Küf türlerinin hepsi mikotoksin meydana getirmezler, ancak toksijenik olarak tanımlanan küfler mikotoksin üretebilmektedir (Jones et al.,1993). Çevre şartlarının uygun olması durumunda mikotoksin üreten oldukça fazla küf türü varlığı belirlenmiştir ve bazı parametrelere göre değişiklik göstermektedirler (Tunail, 2000).

Küfler tarafından üretilen yaklaşık 300-400 mikotoksin varlığı bilinmektedir. Ancak mikotoksin çeşitlerinin %10-15'i insan sağlığıyla ilgili olduğu kabul edilmektedir (Turner et al., 2015; Alshannaq and Yu, 2017).

Mikotoksinlerin farklı kimyasal yapıları, biyolojik etkileri ve farklı türlerde birçok küf tarafından üretilmeleri gibi özelliklerinden dolayı kesin kategoriler altında sınıflandırılması zordur. [Aflatoksin](#) (AF), [okratoksinler](#) (OTA),

[fumonisinler](#), trikotesen (TH), [patulin](#) (PAT), sitrinin (CIT) ve zearalenone (ZEA), araştırmalarda tespit edilen endüstriyel olarak önemli mikotoksin ve gıda kontaminantı olarak bilinirler. (Heperkan, 2003).

Yüzlerce çeşit sekonder metabolit bilinmektedir. Fakat bunlardan sadece birkaçı gıda kontaminantı olarak rol oynamaktadır (Horvath ve ark. 2010).

Çizelge 1. Bazı mikotoksinler ve fizyolojik etkileri (Roseanu ve ark. 2010)

Mikotoksinler	Üretici Organizma	Kimyasal Yapısı	Memeli Hücreleri Üzerindeki Etkisi
Aflatoksin (B1, B2, G1, G2, M1, M2)	<i>Aspergillus</i>	Difuranokumarin türevleri	Karsinojenik
Sitrinin	<i>Penicillium</i>	Benzopiran türevi	Nefrotoksik
Fumonisin	<i>Fusarium</i> <i>Alternaria</i>	Iziflavonoid bileşikleri	Karsinojenik Hepatotoksik
Trikotesen	<i>Fusarium</i> <i>Thricoderma</i>	Seskiterpanoid bileşikleri	Sitotoksik İmmün baskılayıcı Karsinojenik
Okratoksin	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>	Fenilalanine bağlı dihidroizokumarin türevleri	Nefrotoksik Hepatotoksik Teratojenik
Patulin	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>	Doymamış heterosiklik laktonlar	Karsinojenik İmmün baskılayıcı Genotoksik
Zearalenon	<i>Fusarium</i>	Fenol resorsiklik asit lakton	Östojenik aktivite Potansiyel Karsinojenik ve Teratojenik

İnsanlar mikotoksinlere doğrudan [tahıllar](#) veya dolaylı olarak hayvan ürünleri (ör. et, süt ve yumurta) yoluyla da maruz kalabilir ([Kępińska-Pacelik & Biel, 2021](#)).

Dünya nüfusunun hızla çoğalması ve hayvansal ürünlere talebin artması ile yem üretimi olarak artmaktadır. Patojenik mantarlar ekinlerde, çiftlik hayvanlarında hastalıklardan ve gıda ürünlerinin bozulmasından sorumludur ve gıda güvenliğini etkiler. Tahıllar, baklagiller, yağlı tohumlar yanı sıra hayvan diyetlerine yönlendirilen endüstriyel yan ürünlerin tümü mikotoksinler içerebilir (Coppock et.all., 2018).

Bazı *Fusarium* türleri, *Aspergillus* türleri, *Penicillium* türleri ve *Alternaria* türleri trikotesen (TC'ler) ve zearalenon (ZEN), *fumonisinler* (FB'ler), aflatoksinler (AF'ler), okratoksinler (OTA), patulin (PAT), dahil olmak üzere hepsi mikotoksinleri oluşturur (Haque et.all., 2020).

Mikotoksinlerin toksisite dereceleri, maruz kalma derecesine, tüketilen miktara ve konağın duyarlılığına göre değişir. Kendilerini mutajenite gibi farklı klinik son noktalarda teratojenisite, karsinojenisite, nefrotoksisite, sitotoksisite, nörotoksisite, östrojenik ve immünoşüpresif etkiler gösterirler. (Gavahian & Cullen, 2020).

Bu küf ve mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki toksik etkileri mikotoksikozis hastalığı olarak adlandırılır (Peraica et al., 1999). Yüzeyde görünmeyen ama miselleriyle gıdanın içerisine işlemiş küfleri duyuşal analiz ile fark edebilmek önemlidir. Küf gelişmesi yaşanmış ürünün lezzeti, rengi ve kokusu değışiklik göstermektedir. Gıdanın yüzeyinde gelişen küfü sıyırıp veya kesip ürünün devamını kullanmak her ürün için uygun olmamaktadır. Bu durumları fark etmeden küfün tüketilmesi durumunda ortaya çıkabilecek sonuçlar mikotoksinin oranına ve tüketen bireyin hassasiyetine göre farklı sonuçlar göstermektedir. Fazla oranda tüketilmesi durumunda akut toksisiteye veya ölüme sebebiyet verebilir. Bu küf ve mikotoksinlerin az oranda tüketilmesi de bağışıklık sisteminde bozukluklara sebebiyet vermektedir. Küflere az oranda fakat uzun zamanlı maruz kalındığında ise alerjik reaksiyonlar, tümör oluşumu, kronik hastalıklar ve kansere sebep oldukları görölmektedir (Meerdink, 2002; Siegel ve Babuscio, 2011).

Mikotoksinler, ticari gıda ve yem pazarlarının genişlemesinin önünde de büyük bir engeldir, bu yüzden (Ayob ve diğeri, 2021) Avrupa Birliğı (AB) ve ABD'de, gıda veya hayvan yemi olarak kullanılan ürünlerdeki mikotoksinleri azaltmak için yasal düzenlemeler getirmiş ve kullanım sınırları belirlenmiştir (Mannani, Tabarani, El Adlouni, Abdennebi ve Zinedine, 2021).

Dünya genelinde mikotoksinlerin genellikle sağlık ve ekonomik yönden ortaya çıkardığı problemlerden dolayı gıdalarda mikotoksinlerin engellenmesi, kısmen azaltılması veya tamamen yok edilmesine yönelik çalışmalar artmıştır. Detoksifikasyon olarak tanımlanan uygulamalar, alternatif yöntemler geliştirilmiştir (Yılmaz ve Özay, 2001).

1. Penicillium expansum

Penicillium gıda ve ilaç sektöründe büyük öneme sahip olan *ascomycetous* mantarların bir cinsidir. Fakat aynı zamanda gıda kontaminasyonuna en sık neden

olan küf mantarıdır. Toksin oluşturan yaklaşık 100 adet *Penicillium* türü olduğu bilinmektedir. Akut toksik veya bazen teratojenik etki göstermektedirler. *Penicillium* türlerinin çoğu tek bir toksin oluşturmalarına rağmen bazı türler birden fazla toksin oluşturabilirler (Güley ve ark., 2004; Abdel-Wahhab ve ark., 2005).

Penicillium türleri içinden en önemlilerinden biri olan *P. expansum* mantarı, parmak gibi uzantıları ve bu uzantıların uç kısmında sonsuz sayıda spor zincirleri bulunması ile tanınır. Yiyecek maddelerinin yüzeyinde gelişmesi, kendini mavi-yeşil bazen de beyaz lekeler halinde gösterir. *P. expansum* mantarı, ön işleme koşullarında özellikle meyvelerde en sık görülen bozulmaya neden olan mikroorganizmadır. *P.expansum*, sonunda sporların mavi püstüllerinin karakteristik halkalarını üretebilen meyve yumuşak çürüklüğünün hızla yayılmasıyla ilişkilidir ve bu hastalığa 'mavi çürük' adını verilir. İyi bir adaptasyon kabiliyetine sahip olan *P. expansum*, toprakta ve havada her yerde bulunur ve genellikle meyve bahçesi zeminleri veya toprakta çürüyen bitkisel maddeler üzerinde bulunduğundan meyve-sebzeler riskli gıdalardır (Errampalli, 2014). *P. expansum*, patulinin ana üreticisi olarak farklı meyve/sebzeleri enfekte edebilmektedir. Özellikle de yumuşak ve sert çekirdekli meyvelerde ve türevlerinde bulunmaktadır (Prieta ve ark., 1993)

P. expansum, yüzeyleri hasar görmüş meyvelerle alakalı bir küf olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda elmalarda mavı küf çürümelerinden sorumlu, patulin üretme yeteneğinde olan küfler arasında en çok karşılaşılan türdür (Tangni ve ark. 2003, Welke ve ark. 2010, Lawley ve ark. 2008).

Açık kahverengi lezyon yumuşak ve sulu olup, çürümüş ve sağlıklı dokular arasında keskin bir sınır vardır (Errampalli, 2014).). Lezyon meyve dokusunun yüzeyine ve içine hızla yayılır ve geç aşamada meyve mavi-yeşil sporlarla kaplanabilir.

Bu tür, psikrofil özellik göstermekte olup 0 C'de oldukça iyi gelişmekte; fakat aynı zamanda -2 ila -3 C'de de gelişme göstermektedir. Bu tür için optimum gelişme sıcaklığı 25 C, maksimum gelişme sıcaklığı ise 35 C'dir (Morales ve ark. 2010). *P. expansum*'un 15-27 santigrat derece sıcaklık aralığında en verimli şekilde büyüdüğü, daha düşük ve daha yüksek sıcaklıklarda daha yavaş büyüme

gösterdiği ve ıslak koşullarda en iyi şekilde büyüdüğü kanıtlanmıştır (Larous ve ark. 2007). *P. expansum*, yüzeyleri hasar görmüş meyvelerle alakalı bir küf olarak tanımlanmakla birlikte elmalarda mavi küf çürümelerinden sorumlu, patulin üretme yeteneğinde olan küfler arasında en önemli ve en çok karşılaşılan türdür (Tangni ve ark. 2003, Welke ve ark. 2010, Lawley ve ark. 2008).

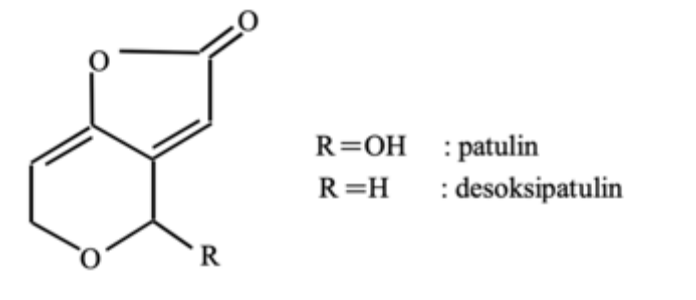
Bu bitki patojeni elma hastalığı olarak bilinmektedir. Ancak armut, çilek, domates, mısır ve pirinç dahil olmak üzere birçok çeşitli konakçıları kontamine edebilir. *P. expansum*, tüketildiğinde zararlı olan bir nörotoksin olan kanserojen metabolit patulin üretir (Morales et.all., 2017)

P. expansum'un büyüme hızı ve patulin üretimi, büyük ölçüde substrat için tipik olan çevresel ve endojen faktörlerden etkilenir (Drush ve Ragab, 2003). En önemlileri su aktivitesi ve sıcaklıktır, ancak atmosfer ve pH'ın da büyük etkisi vardır (Northolt ve diğerleri, 1978 , McCallum ve diğerleri, 2002).

2. Patulin

a. Patulin Yapısı ve Özellikleri

Patulin, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. ve *Byssochlamys* spp.'ye ait geniş bir mantar türü grubu tarafından üretilen bir mikotoksindir. (Kurtzman ve Blackburn 2005). Patulin halkalı yapıya sahip doymamış beta lakton yapıdadır. Kimyasal yapısına bakıldığında kapalı formülü $C_7H_6O_4$ ve toplam molekül ağırlığı 154,12 g/mol olan molekül yapısıdır (Artık, 2007).



Şekil 1. Patulinin kimyasal yapısı (Kadakal ve Nas, 2000).

Patulin, 276 nm'de UV absorbans özelliği göstermektedir (Baert ve ark. 2007). Su, etanol, aseton, etil asetat ve kloroformda çok iyi çözünürken etil eter ve benzende çok az çözünür, petrol eterinde ise hiç çözünmez (Karaca 2005). Proteinlerin sülfidril ve amino gruplarına karşı genellikle reaktiftir (Horvath ve

ark. 2010). Yüksek proteinli gıdalarda patulinin düşük seviyelerde bulunması veya hiç bulunmaması, toksinin bu gıdalarda bulunan sülfidril gruplarıyla reaksiyona girmesine atfedilmektedir (Karaca 2005).

1942 yılında, *P. patulum* ve *P. expansum* kültürlerinden elde edilen patulin, geniş spektrumlu bir antibiyotik bileşiği olarak keşfedilmiştir (Bonerba ve ark. 2010). Patulin üreten küfler; *B. Nivea*, *Byssochlamys fulva* ve *Penicillium expansum*'dur (Delage et al., 2003). Bunlardan en çok küf üretimine sebep olan *P. expansum*'dur (Jackson and Al-Taher, 2008). İzolatlarının tümü %100 patulin üreticisidir (Morales ve ark. 2010). *Penicillium* spp., meyve ve meyve ürünlerinde yaygın bir kirleticidir; örneğin, mikotoksin patulin üretimiyle sonuçlanan mavi küf çürüklüğüne neden olur (Moss 2008).

Patulin (C₇H₆O₄), önemli bir mikotoksin ve gıda kirleticisi olarak kabul edilmektedir (Jimenez et.all., 1988). Isıya dayanıklı bir mikotoksindir. Fiziksel yapısı genellikle beyaz toz haldedir ve suda kolay çözünmektedir. İlk olarak 1940'larda *Penicillium griseofulvum*'dan izole edilmiştir. İlk keşfedildiğinde Gram pozitif ve negatif bakteriler üzerine antibakteriyel etkiye sahip olduğu tespit edildikten sonra bu durum patulinin bir süre antibiyotik olarak kabul edilmesine sebep olmuştur. Ancak daha sonra memelilerde toksik etkisinin kanıtlanmasının ardından antibiyotikler grubundan çıkarılarak mikotoksine dahil edilmiştir. Patulinin kimyasal adı anhidro-3-hidroksimetilen-tetrahidro-1,4-piron-2-karboksilik-asittir (Moake ve ark., 2005)

Gıdalarda patulinin gelişmesi için optimum sıcaklık değerleri 0-25 °C'de, en düşük su aktivitesi ise 0,95 elma sularında ise pH 3.2-3.8 aralığında olmaktadır (Lawley ve ark. 2008, Morales ve ark. 2010).

b. Patulinin Sağlık Üzerinde Etkileri

Patulin, genotoksik ve mutajenik etki gösteren bir mikotoksindir (Errampalli, 2014). Kanserojen ve mutajenik etkiler de dahil olmak üzere ciddi akut ve kronik toksisiteye neden olabileceğinden, insan sağlığı açısından büyük bir endişe kaynağıdır. Patulin, grup-3 kanserojen olarak sınıflandırılmıştır; bu, insanlarda kanserojen olduğuna dair hiçbir kanıt olmadığı ve deney hayvanlarında karsinogenez hakkındaki verilerin seyrek olduğu anlamına gelir (IARC 1987). Ancak birkaç çalışma patulin'in teratojenik ve genotoksik

olduğunu bildirmiştir (Liu ve ark. 2003). Patulin, insanlarda ödem, bağı dokü iltihaplanması, kan şekeri yükselmesi ve hipertansiyona sebep olmaktadır. Ağız yoluyla alındığı zaman bulantı, kusma ve mide rahatsızlıkları görülebildiği gibi böbreklerde tıkanıklık, idrar yollarında hasara yol açabilir (Tunail, 2000).

Literatüdeki çalışmaların sonucunda patulin oluşumunda çevresel faktörlerin etkisinin oldukça fazla olduğu sonucunda varılmıştır. Bu faktörler meyve çeşidi, pH ve sıcaklık gibi parametrelerdir. Patulin, insanlarda, ülserasyon ve kanamaya ve bağırsak bozukluklarına neden olduğu bildirilen toksindir. Patulin, sitotoksitesi, genotoksitesi ve immünosupresif özellikleri nedeniyle memeli modellerinde mide ve ince bağırsakta kanamaya neden olmaktadır (Wright ve ark., 2014; Barad ve ark., 2016). Ancak küçük çocuklar için orta derecede toksik bir mikotoksin olarak kabul edilir. Kontamine elma suyu ve diğer elma bazlı ürünlerin ana tüketicileri için önemli toksisite sergiler. (Sanzani ve ark., 2010)

Toksisite çalışmaları, *P. expansum* mantarı tarafından üretilen patulinin kronik olarak mutajenik, immünotoksik, genotoksik ve nörotoksik etkilere sahip olduğunu ve karaciğer, böbrekler ve bağışıklık sistemi dahil olmak üzere hayati organlara ve sistemlere zarar verdiğini göstermiştir (Bozzo ve ark., 2011; Garcia-Cela ve ark.2012).

c. Patulinin Bulunduğu Gıdalar

İnsanların patuline maruz kalmasındaki en önemli örnek enfekte, bulaşmış, çürümüş gıdalardır. Özellikle ortam koşulları (sıcaklık, nem vs.) ürünün kalitesini ve muhafazasını etkiler. İnsanlar için patulinin ana kaynağı enfekte olmuş meyvelerdir. Meyvelerin patulin ile kontaminasyonu hasat ve hasat sonrası meyvelerin depolanması, paketlenmesi, taşınması ve işlenmesi gibi aşamalarda meydana gelebilir (Tournas, 2005).

Farklı bozulma mikroorganizmaları farklı besin gereksinimlerine sahip olduğundan, belirli mantar türleri belirli gıda ürünlerini ve hatta meyveleri kontamine eder. *P. expansum* şeftali, kiraz gibi çekirdekli ve çekirdekli meyveleri ve "mavi çürüklüğe" neden oldukları meyveleri tercih eder (Moss, 2008 ; Tannous ve ark., 2018).

Fakat elmalarda mavi çürümeye sebep oldukları için genellikle elma, elma suyu, elma şarabı ve elma sirkesinde gelişim gösterir (Ren ve ark., 2011; Wei ve ark., 2020). Değişik ve çeşitli elmalarda bulunan asidiklik ve pH, patulin oluşumuna etki etmektedir (Morales ve ark., 2006).

P. expansum en çok elmada mavi küf çürümesine de sebep olan bir mantar türüdür. Elma ürünlerine ek olarak, armut, çilek, mango, kayısı , üzüm, muz veya domates gibi diğer meyve, sebze ve bunların ürünlerinde de patulin tespit edilmiştir (Moake ve ark., 2005, Moss, 2008).

d. Patulin ile İlgili Yasal Düzenlemeler

Tüketilmesi durumunda insanlarda yarattığı ciddi sağlık tehlikeleri nedeniyle, Avrupa Birliği ve Amerika Birleşik Devletleri'nin yanı sıra diğer uluslararası ve ulusal kuruluşlar tarafından izin verilen maksimum patulin seviyesine sınırlar getirilmiştir. Elma suyu ve elma şarabında patulin için maksimum sınır $50 \mu\text{g l}^{-1}$ 'dir (FDA, 2005).

Avrupa Birliği ise bu seviyeleri tüketen kitlelerin yaş gruplarına göre belirlemiştir. Maksimum tolere edilebilir patulin seviyesi normal sağlıklı yetişkinlerde sıvı gıda ürünleri için $50 \mu\text{g/kg}$ ve katı gıdalar için $25 \mu\text{g/kg}$ ile sınırlıdır. Bebekler ve çocukların patulin toksisitesinden korunması için ise meyve bulunduran gıdalarda sınır $10 \mu\text{g/L}$ 'dır (Sanzani vd., 2010; Barad vd., 2016; Coton vd., 2019 ;).

Patulin molekülünün kararlılığından dolayı, üretimden sonra elma ürünlerinde hala yüksek seviyelerde patulin kalmaktadır (Silva ve ark. 2007). Bu nedenle Avrupa Birliği, tüketiciye sunulan ve elma içeren ürünlerde, izin verilen en yüksek patulin miktarlarının belirlenmesi için uluslararası yasal düzenlemeler ortaya koymuştur (Barreira ve ark. 2010, Topçu ve ark. 2010). Elma sularında bulunan patulin miktarına sınırlandırma getirilmesinin sebebi, elma suyunu genellikle bebek ve çocukların tüketmesidir (Dombrink-Kurtzman 2006).

Toksik etkileri sebebiyle patulinin ortadan kaldırılması üzerine umut verici yöntemler geliştirilmiştir. Isıya dayanıklı bir lakton olduğundan pastörizasyon veya termal denatürasyonla yok edilmez. Mikotoksin detoksifikasyon yöntemleri, bileşiklerin karbon dioksit ve suya kadar tamamen parçalanmasını sağlamalıdır. Bu parçalanma, her zaman mümkün olmayabilir ve bu parçalanma esnasında yan

ürünlerin oluşumu izlenebilir. Bu yeni oluşan ürünler, ondan daha yüksek toksikolojik özelliklere sahip olabilmektedir. Patulin gibi basit bir kimyasal yapıya sahip mikotoksinler, aflatoksin gibi karmaşık yapıya sahip olan mikotoksinlere göre tamamen parçalanmaya daha çok eğilim göstermektedir (Karaca ve ark. 2010). Patulin üreten mantarları kontrol etmek için birçok yaklaşım uygulanmıştır. Benzer şekilde, kontamine meyve sularında patulini parçalamak için bazı fiziksel (UV ışınlama), kimyasal (ozon) işlemler veya biyolojik enzimler, kimyasal fungusitler veya LAB (laktik asit bakterileri) ile aşılama uygulamaları kullanılmıştır (Ioi ve ark., 2017).

Özellikle, LAB *P. expansum* küfü ve patulin mikotoksini üzerinde etkili bir inhibitör olduğu, küf sporlarının çimlenmesini önlediği, misel büyümesini geciktirdiği ve çok sayıda gıda ürünüde mikotoksin üretimini azalttığı bulunmuştur kanıtlanmıştır (Gerez ve diğerleri, 2009 ; Ghanbari ve diğerleri, 2013 ; Leyva Salas ve ark., 2017 ; Pawlowska ve ark., 2012 ; Sadiq ve ark., 2019 ; Yépez ve ark., 2017). LAB'ler genellikle güvenli olarak kabul edilir (GRAS) ve tüketici sağlığını geliştirmek için gıdalara daha sık eklenir (Mokoena ve ark., 2016; Nuraida, 2015)

D. Mikotoksin Engellenmesinde Kullanılan Yöntemler

Mikotoksinler insan sağlığını etkilediği gibi tohum, ürün ve yem kalitesinin düşmesine, gıda güvenliğinin riske girmesine sebep olmaktadır (Evren ve ark., 2012). Bu sebeplerden dolayı mikotoksin detoksifikasyonu yöntemleri önem kazanmaktadır. Detoksifikasyon; gıdalardan kanserojen gibi zararlı, toksik bileşenlerin uzaklaştırılması işlemidir. Mikotoksinler yapılarına, ortam koşullarına göre farklılıklar gösterebilirler. Bazı mikotoksinler ısıya ve aside dayanıklılık gösterirken bazı mikotoksinler psikrofil yapıda olup aynı zamanda alkali ortamlarda bulunabilirler. Günümüzde birçok sektörde küf ve mikotoksin varlığı gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından risk oluşturduğundan dolayı mikotoksin oluşumunu tamamen engellemek mümkün olmasa da kısmen azaltmaya yönelik yöntemler geliştirilmiştir. Mikotoksinlerin degradasyonu amacıyla yapılan çalışmalarda fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Detoksifikasyon yöntemleri esnasında; hem gıdanın içerisindeki toksin inaktif hale getirilmeli, parçalanmalı veya uzaklaştırılmalı hem de bu

aşamalar gerçekleşirken gıda güvenliği sağlanarak ortamda yan ürünler, toksik maddeler oluşmamalı ve ürünün besin kalitesi korunmalıdır. Gıda tüketiciler için tüketilebilir durumda olmalıdır (Omak ve ark., 2016).

1. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemlerle besin maddelerinden mikotoksinlerin uzaklaştırılmasında temel prensip hasarlı ve küf üremesi görülen tanelerin uzaklaştırılmasıdır (Yılmaz ve Özay, 2001). Fiziksel yöntemler genellikle daha düşük maliyetli ve kolay uygulanan süzme, ekstraksiyon, ısı, ışın gibi uygulamaları içerir. Fiziksel detoksifikasyon yöntemleri mikotoksin degradasyonu amacıyla literatürde fazla çalışılan yöntemlerdir. Uygulanmasının kolay olması ve daha az zaman alması gibi avantajları bulunmaktadır (Özdemir ve Özilgen; 1995).

Taniwaki et al. (1992), elmalara *Penicillium expansum* suşunu aşılama işleminden sonra, elmalar zararlı dokuların çapı belli bir miktar azalana kadar 25°C'de depolanmıştır. Depolama sonunda elmalar patulin analizine tabi tutulmuşlardır ve patulinin büyük bir bölümü hücrenin zararlı kısmının ilk 1cm'inde bulunduğu görülmüştür. Bunun sonucunda zararlı dokunun temizlenmesinin elmayı patulin açısından temizlenmiş duruma getirmek için yeterli olmadığı belirtilmiştir. Pastörizasyon gibi ısı uygulamaları desteği mikotoksin uzaklaştırma işleminde kullanılan etkili yöntemlerdir.

Welke, Hoeltz ve Dottori (2009), elma ve elma suyu ile yaptıkları çalışmada elmadan elma suyuna işleme yoluyla geçen patulin kaybının %75.2 olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada pastörizasyon, öğütme, buharlaştırma, enzimatik işlem gibi birden fazla yöntem uygulanmıştır. Elmadaki patulin içeriği öğütme işleminde 255 ile 653 µg/kg, pastörizasyondan sonra 131–406 µg/L aralığında seyretmiştir. Enzimatik işlemde sonra ise 91–244 µg/L, ve buharlaştırmadan sonra 56'dan 231 µg/L'ye düştüğü izlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, elma suyunda pastörizasyon, enzimatik işlem ve buharlaştırma ile sonuçlanan ortalama patulin kayıplarının sırasıyla %39.6, %28.3, %20.1 ve %28.4 olduğunu hesaplamışlardır. Bu yöntemlerin hepsinde elma püresindeki patulin içeriğinin azaldığı ve patulin seviyelerinin orijinal içeriğin %29'undan %80'ine düşürüldüğü kanıtlanmıştır.

Artık ve ark. (2001) elma suyuna aktif kömür kullanımını uygulamışlardır. Bu uygulama sonucunda patulin seviyesinin en yüksek %40.9 oranında azaltıldığı sonucuna varmışlardır. Ancak renk ve fenolik içeriğinin ise önemli derecede azaldığı bildirilmiştir (Moake ve ark. 2005).

Ancak bazı güvenlik kriterlerinin bu yöntemlerde garanti edilememesi de söz konusudur. Örneğin mikotoksin degradasyonunda kullanılan UV ışın uygulaması gıdada ve buna bağlı olarak insan sağlığında risk oluşturma ihtimaline sahip bir yaklaşımdır. Başka bir araştırmada patulin mikotoksininin bozunması UV ışını uygulamasıyla fiziksel olarak gerçekleştirilmiştir. Bu fiziksel uygulamanın patulin üzerinde %94,8 oranında etkili olduğu kanıtlanırken aynı zamanda besin kaybı sonuçlarına ve buna bağlı olarak gıda güvenliği sorunlarına sebep olduğu bildirilmiştir (Diao et.all., 2019)

Fiziksel uygulamalardan ısı ile inaktivasyon oldukça yaygındır. Pastörizasyon, besin maddelerinde bulunan hastalık yapıcı ve patojen mikroorganizmaları inaktif hale getirmek için 60 °C'den 100 °C'ye kadar uygulanan ısıl işlem yöntemidir. (Anonim, 2012a). Ancak bazı mikotoksinler ısıya karşı direnç gösterdiklerinden gıdaya uygulanan sıcaklığın 300 °C ve üstüne kadar çıkartılması gerekebilir. Bu kadar yüksek ısı besinlerin kimyasal yapısında ve buna bağlı olarak gıda güvenliğinde bozulmalara neden olup sağlık riski yaratabilmektedir. Daha düşük sıcaklıklar mikotoksinde kısmi parçalanmalar yaratmaktadır.

Örneğin patulin, ısıya dirençli ve kararlı yapısından kaynaklı elma suları ve elma suyu konsantrelerinde pastörizasyon gibi proseslerle etkisiz hale getirilememektedir. Çünkü patulin, asidik ortamda ve yüksek sıcaklıklarda da kararlı kalan bir yapıya sahiptir (Bonerba ve ark. 2010, Kadakal ve Nas, 2003b). Pastörizasyon yolu ile detoksifikasyon üzerine çalışan Lovett ve Peeler (1973), *Penicillium expansum* ile çürüttükleri elmalardan ürettikleri elma suyunda uyguladıkları pastörizasyon sonrası patulin miktarının %33 oranında azaldığını tespit etmişlerdir. Pastörizasyon işlemi patulin mikotoksinini kısmen engelleyerek azaltmış fakat yok edememiştir.

Özçelik (1979), elma üzerinde yaptıkları çalışmada Erzincan elmalarını *P. expansum* ile aşlamıştır. Elma sularını ayırarak; ilk gruptaki elma sularına ısıl

işlem uygulanmadan, ikinci gruptaki elma suyu örneklerine ise 70, 80, 90, 100°C'de 20 dakika ısıl işlem uygulanarak patulin miktarları karşılaştırılmıştır. Uygulanan ısıl işlemin patulin miktarı üzerinde önemli etkiye sahip olmadığı ısıl işlemlerin patulini kısmen engelleyebildiği tespit edilmiştir.

Moake ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada 60–90 °C'de 10 saniyelik pastörizasyon işlemleri, patulin oranını %18.8 azaltabildiği rapor edilmiştir.

Kadalkal ve Nas (2003b) çalışmalarında, farklı ısı uygulamalarının patulin seviyesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada 5, 10, 15 ve 20 dakika aralıklarla 90 ve 100 °C'lik ısı uygulaması ve 70 ve 80 °C'lik evaporasyon işlemleri uygulanmıştır. Bu sıcaklıkların patulin ve elma suyunun diğer özellikleri üzerindeki etkisini incelenmiştir. Isıtma ve evaporasyon süresi arttıkça, elma sularında patulin oranının azaldığı gözlenmiştir. 20 dakika, 90 ve 100 °C'lik ısı uygulaması sonunda patulinin sırasıyla %18.81 ve %25.99 oranında azaldığı rapor edilmiş. 70 ve 80 °C'lik evaporasyon sonucunda ise sırasıyla %9.40 ve %14.06 oranında azaltılabildiği gösterilmiştir.

Fiziksel uygulamaların mikotoksin degradasyonunda yetersiz kaldığı bu gibi durumlarda başka alternatif yöntemlere başvurulmaktadır. Bazı ürünlere mikotoksin miktarını kısmen azalttığı tespit edildiğinden kimyasal ve biyolojik yöntemlere başvurulduğu dikkat çekmektedir. Özellikle bakteri ve enzimlerin kullanımı oldukça yaygınlaşmaya başlamıştır.

2. Kimyasal Yöntemler

Kimyasal detoksifikasyon gıdalarda mikotoksin varlığını engellemek veya azaltmak amacıyla kimyasal maddelerin ürüne eklenmesini kapsar (Yılmaz ve Özay, 2001). Hayvan yemlerinde amonyak ile detoksifikasyon uygulamasının yanısıra hidrojen peroksit, sodyum hidroksit/hipoklorit, metilamin, kalsiyum hidroksit ve diğer alkalilerin, bir insektisit olan dichlorvos'un tarçın gibi bazı bitki ekstraktlarının aflatoksinini parçalayıcı ve azaltıcı etkileri saptanmıştır (Tosun, 1996). Kimyasalın, gıda maddesinde toksik bir kalıntı bırakmaması, gıda maddesine zarar vermemesi buna bağlı olarak gıda ve tüketici güvenliğinde risk oluşturmaması gerekmektedir (Yılmaz ve Özay, 2001; Sinha;1998).

Örneğin ozon ve hidrojen peroksit uygulamaları mikotoksin degradasyonunda yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Ozon, atık suların

dezenfeksiyonunda ve gıda endüstrisinde mikroorganizmaların inaktivasyonunda kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra mantar gelişimini kontrol altına almada ve mikotoksin konsantrasyonunu kısmen de olsa azaltmada kullanılabilir. Dwarakanath ve ark. ozon ile detoksifikasyon yöntemini kullanarak, pamuk tohumu ve yer fıstığı küspesinde aflatoksinleri azalttığını rapor etmişlerdir. Pamuk tohumu küspesinde total aflatoksin oranının 214 ppb'den 20 ppb'ye indiğini ve yer fıstığı küspesinde patulin oranında %78 yıkımlama olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla beraber, ozon uygulaması, ürünlerin protein etkinlik oranını da azaltmıştır (Keser ve Kutay, 2008).

Karaca ve Velioğlu (2009) tarafından yapılan bir çalışma ile patulinin ozona karşı hassasiyet gösterdiği bulunmuştur. Başlangıçtaki patulin derişiminin, 1 dakikalık ozon muamelesi sonucunda %98'e kadar parçalanmış olduğu gözlemlenmiştir. Spektrometrisi yöntemleri ile yeni herhangi bir yan ürünün veya toksik bir ürünün oluşumu gözlenmemiştir.

Amonyak ile muamelede, patulin seviyelerinin laboratuvar artığında %99,9, meyve suyunda ise %99,8'e kadar indirildiği; fakat meydana gelen ürünün kullanıma uygun olmadığı bildirilmiştir (Fremy ve ark. 1995).

H₂O₂ ekonomik olması, hazırlanma kolaylığı ve aflatoksin parçalanmasında etkin ve önemli bir kimyasal olmasından dolayı birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada aflatoksin parçalanmasının %85,5 olabilmesi için gerekli optimum koşulların %0,08 H₂O₂'nin 0,7 dakika uygulanması sonucu elde edildiği bildirilmiştir (Yılmaz ve Özay, 2001).

Aynı şekilde başka bir araştırmada Diaz ve ark. düşük düzeydeki (hayvan başına 45 g/gün) aktif kömürün sütteki aflatoksin kalıntısını önemli derecede azaltmadığını bildirmişlerdir. (Avantaggiato, 2004).

Her ne kadar fiziksel ve kimyasal yöntemler değişen derecelerde başarı ile karşılanırsa da, sınırlı etkinlik ve önemli besin maddelerinin kayıpları hala bunların gıda endüstrisindeki uygulamalarını engellemektedir. Kimyasal yöntemler kullanılarak yapılan uygulamalarda ürüne eklenen bu tür kimyasallar mikotoksin açısından ürünü güvenilir kılmasının yanı sıra üründe toksik yan ürünler oluşmasına ve besin değerinde azalmalara sebep olabilir. Gıda güvenliği ve buna bağlı olarak insan sağlığı açısından risk oluşturabilecek durumlar ortaya çıkabilir.

3. Biyolojik Yöntemler

Günümüzde mikotoksinlerin kimyasal ve fiziksel yöntemlerle detoksifikasyonunun dışında, biyolojik detoksifikasyon da ağırlık kazanmıştır (Varga ve ark., 2000). Mikotoksin ile bulaşmış tarımsal hammaddelerin engellenmesi üzerine birçok strateji araştırılmasına rağmen çoğu uygun bulunmamış insan sağlığı açısından elverişsiz olarak değerlendirilmiştir (Karaca ve ark., 2010). Farklı yöntemler mikotoksin engellenmesinde olumlu sonuçlar vermelerine karşın yüksek maliyet ve gıdada besin kayıpları veya toksik madde oluşumu gibi olumsuz durumlara sebep olabilirler. FAO, fiziksel ve kimyasal adsorbanlar kullanılarak mikotoksinlerin detoksifikasyonu üzerine yapılan çalışmalar sonucu elde edilen başarıların sınırlı kaldığını belirtmiştir (Fuchs ve ark., 2008). Biyolojik detoksifikasyon çalışmalarında, mikotoksinleri parçalama veya engelleme yeteneklerinden dolayı mikroorganizmalar arasında özellikle maya ve laktik asit bakterileri araştırma konusu olmuştur (Reddy ve ark., 2011, Topçu ve ark., 2010).

Mikotoksinleri kontamine olmuş substratlardan fiziksel ve kimyasal yöntemlerle ortadan kaldırma girişimlerinin yanı sıra, mikropların mikotoksinleri parçalama yeteneği artık geniş çapta incelenmektedir. Dekontaminasyon için en iyi çözümün, biyolojik detoksifikasyon olacağı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Aynı zamanda bu yöntemin zararlı toksik madde yaratabilen kimyasalların kullanılmasını azaltabileceği ve gıda/yemlerde besin değerleri ve yenilebilme özelliklerinde önemli kayıplara neden olmayacağı ve gıda güvenliğinin korunacağı fikrinde birleşmektedir. Isıya, alkali veya asidik ortamlara dayanıklı mikotoksinlerin degradasyonunda ürüne biyolojik enzimlerin, antagonistik mayaların, toksijenik olmayan küflerin veya gıda koruyucusu olarak bilinen laktik asit bakterilerinin aşılınması gibi yaklaşımların uygulanması gerekebilir. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı aflatoksin 270 °C sıcaklığa kadar gelişimini sürdürebilmektedir. Gıdaya uygulanan bu yüksek ısı besinlerin yapısında bozulmalara sebep olabileceğinden biyolojik yöntemler alternatif yaklaşımlardır.

Biyolojik yöntemler arasında mikrobiyel inaktivasyon yöntemi oldukça yaygın bir uygulamadır ve araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir (Keser ve Kutay, 2008). Biyolojik detoksifikasyon yöntemlerinde çeşitli bakteri, maya, küf ve enzim türlerinin gıda içerisine inoküle edilmesi kullanılmaktadır.

LAB kullanımını antifungal özelliklerinden dolayı önem arz etmektedir. (Kabak ve Var, 2006; Kabak ve Var, 2004; Karlovsky, 1999).

Flavobacterium auranticum B-184 suşunun bazı gıdalarda aflatoksin B₁'i azalttığı veya tamamen ortadan kaldırdığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş ve bu çalışmalarda aflatoksin B₁'in azalmasında bakterinin enzim veya enzim sisteminin rol oynadığı ve toksinin canlı *F. auranticum* hücreleri tarafından aktif olarak metabolize edildiği görülmüştür (Yılmaz ve Özay, 2001).

Yapılan başka bir çalışmada Yue ve ark. (2011), inaktif hale getirilmiş 10 tane maya suşunu biyolojik detoksifikasyon yönteminde kullanmışlardır. Bu maya suşlarından 8 tanesinin elma suyunun patulin oranını %50 oranına kadar, diğer 2 suşun ise patulini %72 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Li ve ark (2019) yaptıkları çalışmada patulin bozunmasında *Rhodotorula mucilaginosa*, enzimi kullanmıştır. *R. mucilaginosa* patulin'in 35 °C'de 21 saat süreyle detoksifikasyonunda etkili olmuştur. 21 saat sonra patulin'in %90'a kadar önemli ölçüde azalttığı kanıtlanmıştır. *R. mucilaginosa* giderim kapasitesinin sıcaklığın 20 °C'den 35 °C'ye çıkarılmasıyla önemli bir artış gösterdiği, daha sonra 40°C'de azaldığı bildirilmiştir. 35 °C'de *R. mucilaginosa* patulin'in %90'ını çıkarma kapasitesine ulaştığı kanıtlanmıştır.

Özellikle LAB'ın küf sporlarının ve misel gelişmesini önlediği, yavaşlatıp geciktirdiği ve birçok gıdada mikotoksin üretimini azalttığı bulunmuştur (Gerez, Torino, Rollán ve Font de Valdez, 2009). LAB'ın aflatoksin üretimini inhibe edebildiklerini keşfeden Maing ve arkadaşları olmuştur. Araştırmacılar, *Lactobacillus delbrueckii* ile fermente edilen soya sosu örneklerinde fermentasyon sırasında aflatoksin oranının *Lactobacillus delbrueckii*'yi içermeyen örneklerdekine göre daha az olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Guillaume ve ark (2021) elma suyunda yaptıkları çalışmada laktik asit bakterisi olan *Leuconostoc mesenteroides* suşunu kullanarak *Penicillium expansum* küfünün ürettiği patulin mikotoksinini azaltarak laktik asit bakterisinin antifungal aktivite gösterdiğini kanıtlamışlardır. *P. expansum* kolonilerinin çapları, 1×10^8 , 1×10^9 ve 1'de laktik asit bakterisi eklenmesiyle sırasıyla $26,15 \pm 0,60$, $15,15 \pm 0,58$ ve $00 \pm 0,00$ mm'ye önemli ölçüde azalmıştır. Buna bağlı olarak *L. mesenteroides* ile inkübe edilen elma suyundaki patulin içeriğinin 5,8

$\mu\text{g/mL}$ olduğu tahmin edilmiştir. Önemli olarak, başlangıçtaki patulin içeriğinin %19,4'ü, HM elma suyunun $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de LB7 ile 24 saatlik inkübasyonundan sonra önemli ölçüde ($P < 0,05$) elimine edildiği kanıtlanmıştır.

Benzer şekilde Hawar ve ark (2013) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus plantarum* bakterisi *Penicillium expansum* çimlenmesinde ve misel gelişmesinde inhibitör olarak kullanılmıştır. LAB'nin probiyotik suşları, *P. expansum*'un büyümesini geciktirme ve patulin üretimini etkileme yetenekleri açısından taranmıştır. Patulin engellenmesinde *Lactobacillus plantarum* etkili olmuştur. *Penicillium expansum*'un büyümesi, *Lactobacillus plantarum*'un iki suşunun 48 saatlik hüresiz süpernatana maruz kalma nedeniyle önemli ölçüde kısıtlandı. *P. expansum* tarafından oluşturulan toksik bir ikincil metabolit olan patulin'in, *L. plantarum* hücrelerine ve hücre içermeyen süpernatana maruz kalması üzerine biyotransformasyonu, vurgulamaktadır. 10^{10} hücre ml^{-1} ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) ile 4 saatlik inkübasyonun ardından patulin'in %80'e kadarı biyolojik olarak dönüştürülmüştür.

Üç günlük *Lactobacillus lactis* kültürleriyle küf sporlarının eş zamanlı eklenmesi sonucu küf üremesi inhibe olduğu halde; *Lactobacillus lactis* suşu üç günlük küf kültürüne eklendiğinde küf üremesi uyarılmıştır. Çalışmada 13 günlük *Streptococcus lactis* kültürünün aflatoksin düzeyini tamamen düşürdüğü halde iki kültürün aynı anda eklenmesi durumunda ise inkübasyon periyodu boyunca aflatoksin miktarının arttığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada 19 tür laktik asit bakterisinin *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus stolonifer* ve *Rhizopus ssp.*'ye karşı etkisi incelenmiştir. Sonuçlara göre *L.lactis* subs.*diacetylactis* DRC1 ve *Streptococcus thermophilus* 483 en etkili suşlar ve *A.fumigatus*'un da en duyarlı küf olduğu bulunmuştur. Ayrıca ticari silaj için kullanılan laktobasil türlerinin *A.flavus* subs. *parasiticus* üremesini ve toksin üretimini azalttığını belirtmişlerdir (Yılmaz ve Özay, 2001).

Yapılan çalışmalara bakıldığı zaman uygulanan fiziksel ve kimyasal detoksifikasyon stratejilerinin, gıdanın duyuşal özelliklerini değiştirmeleri ve gıdanın besinsel değerinde yaşanan kayıplar, toksik madde üretebilme ihtimalleri, gıda güvenliğinde risk oluşturmaları, ekonomik olmamaları gibi dezavantajlarının bulunması insan sağlığı açısından biyolojik yöntemleri daha avantajlı kılmaktadır (Omak ve ark., 2016).

E. Laktik Asit Bakterileri ve Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri (LAB), Gram pozitif, prokaryotik hücre yapısına sahip spor oluşturmeyen mikroorganizmalardır. Karbonhidrat fermantasyonu sonucunda başlıca son ürün olarak laktik asit oluşturan yeteneğine sahiptir. Fiziksel özellikleri bakımından hareketsiz çubuk ya da kok şeklinde olabilirler. Gıdalarda doğal olarak da bulunabilirler. Bu ürünlere örnek olarak et, süt ve sebzeler verilebilir. LAB'ların en önemlileri; *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, ve *Weissella*'dır. Bu grup bakteriler zararsız olarak kabul edilmektedirler ve GRAS statüsünde yer almaktadırlar. Glikozu laktik asite çevirmeleri ile bilinirler ve bütün LAB anaerobik (oksijensiz ortam) ortamlarda altında gelişim gösterebilmektedir. Fakat oksijene karşı duyarlı değildirler, oksijen varlığında da varlıklarını sürdürebilirler. Hem aerobik hem de anaerobik ortamlarda gelişebilen organizmalar 'aerotolerant anaerob' organizmalar olarak adlandırılmaktadırlar. LAB, ayrıca endüstriyel öneme sahip mikroorganizmalardır. Çünkü sağlık ve beslenmedeki faydaları ve fermentatif kabiliyetlerinden dolayı oldukça fazla tercih edilirler (Şimşek and Bilgin, 1996, Pfeiler ve Klaenhammer, 2007).

LAB organik asit, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit, antifungal peptitler ve bakteriyosinler gibi çok çeşitli antimikrobiyal bileşikleri üretebilme kapasitesine sahip olduğu için gıda koruyucusu olarak kullanım açısından ilgi odağı olmuştur (Holpzapfel et.all. 1995; Magnusson and Schnürer, 2001). Laktik asit bakterilerinin antagonistik aktivite mekanizmaları içerisinde bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen "bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri" bileşiklerdir (Aşkar vb.,1999).

Bakteriyosinler, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, bakterisidal aktivite sergileyen aktif proteinlerdir. LAB'ların pek çok cinsinin bakteriyosin ürettiği bilinmektedir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanıldığı ve oldukça faydalı özellikler sergileyebildiğini açıkça gözler önüne sermiştir. Gıdalara koyucu olarak bakteriyosin ilavesi ile; gıdaların raf ömrü uzatılabilmekte, belirli sıcaklıklarda maksimum koruma sağlanmakta, gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmalar nedeni ile

yaşanan ekonomik kayıplar en aza indirgenmekte, kimyasal koruyucuların kullanımları azaltılabilmekte, koruma için daha az prosesin uygulanması sebebi ile ürünün besinsel değeri ve kalitesi de daha iyi korunabilmektedir (Thomas ve Wimpenny, 1996).

LAB, et ve balık ürünleri, süt ürünleri, tahıl ürünleri ve sebzeler gibi gıdalarda starter kültür olarak ilave edilebilmektedir. Bu şekilde gıdaların olgunlaştırılması, dayanıklılığının artırılmasında önemli rol oynarlar (Tangüler ve Erten, 2006). Antifungal özellik gösteren LAB çeşitli gıdalarda ve hayvan yemlerinde kullanılmaktadır. Doğal içeriklere sahip maksimum kalitedeki gıdaların üretimi konusundaki ihtiyaç ile birlikte gıda bozulmalarını engellemede LAB'ın biyokoruyucu olarak kullanılmasına odaklanılmıştır.

1. *Leuconostoc mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides fakültatif, Gram pozitif, hareketsiz, ve küreseldir. Genellikle çiftler ve zincirler halinde merceksi kokoid hücreler oluşturur, ancak bazen uzun zincirlerde yuvarlak uçlu kısa çubuklar oluşturabilir. *L. mesenteroides* en iyi 30°C'de büyür, ancak 10°C ila 30°C arasındaki sıcaklıklarda hayatta kalabilir. Optimum pH'ı 5,5-6,5'tir, ancak yine de pH 4,5-7,0'da büyüme gösterebilir. *L. mesenteroides* tipik olarak çok çeşitli etli meyve ve sebzelerin derisinde bulunur.

Genellikle endüstriyel süt üretiminde başlangıç (starter) kültürleri olarak kullanılırlar. Çevredeki ortamın pH'ını düşüren laktik asit üretme yeteneğine sahiptir ve asidik ortamı tolere edemedikleri için diğer rakip gıda bozucu organizmaların büyümesini engeller. Bu yüzden antifungal, antimikrobiyal özellikleri gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Özcan ve ark., 2019; Dols ve ark., 1997) .

Bu tez çalışmasının amacı LAB olan *L. mesenteroides*'in elma yüzeyinden izole edilen *Penicillium* türlerinden *Penicillium expansum* ve buna bağlı aktivasyon gösteren patuline etkisini değerlendirmektir. Farklı ortamlarda (aerob-anaerob) muhafaza edilip küf ve laktik asit bakterisi ile muamele edilen elma sirkeleri baz alınarak yapılan bu çalışmada LAB'ın küfe ve mikotoksine etkisi incelenmiştir. Çalışma ile paralel şekilde sirke üzerinde mikrobiyolojik ve kimyasal analizler yapılmıştır.

II. MATERYAL VE METOT

A. Materyal

1. Kullanılan Malzemeler

Hassas terazi (AND GR200, Japonya)

Otomatik Pipetler

Beher

Mezür

Balon joje

Erlen

Büret

Huni

Plastik Petri Kutuları

Cam Petri

Spatül

Filtre Kağıdı

Etüv (Binder ED240, Almanya)

Otoklav (Hiclave Hirayama HV-110L)

Manyetik Karıştırıcı (DLab, Çin)

Vorteks (Handy-LAB/NB-105V, Tayvan)

Refraktometre (Reichert Leica Abbe MarkII, USA)

Spektrofotometre (PG Instruments T60UV-Visible, İngiltere)

Spektrofotometre Küvetleri

2. Kullanılan Kimyasallar

MRS, PDA, YGC Agar (Merck)

DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) Merck

Metanol (Merck)

Fenolftalein (Merck)

Sodyum Hidroksit (NaOH)

Gallik asit

Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)

Aliminyum Klorür (AlCl_3)

Folin Ciocalteu Fenol Reaktifi

%0,1'lik Asetik Asit

%2'lik Asetik Asit

%100'lik Asetik Asit

Asetonitril

%1'lik NaHCO_3

Dietil Eter

Etil Asetat

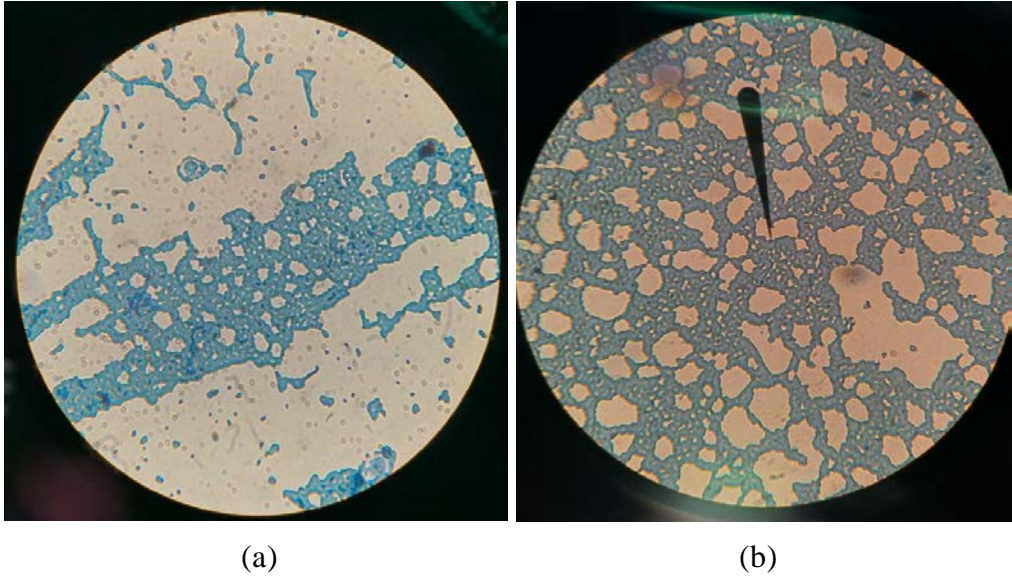
B. Yöntem

Elma sirkeleri laboratuvar ortamında üretildikten sonra daha önce izole edilen küf ve bakteri aşılması yapılmıştır. Sirkelerin 0, 7, 15 ve 30. günlerinde pH, toplam asitlik, suda toplam kuru madde (briks), toplam fenolik madde, toplam kuru madde, antioksidan aktivite tayini, toplam flavonoid, toplam alkol ve patulin analizleri ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır.

C. Metot

1. Patulin Detoksifikasyonunda Kullanılacak Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu

LAB eldesi için MRS yatık agar hazırlanıp otoklava atılmıştır. Deney tüpleriyle otoklava atılan MRS agar yatık halde donmaya bırakılarak yatık agar elde edilmiştir. Yatık agarlar donduktan sonra *L. mesenteroides* bakterisi alev yanında steril bir öze yardımıyla ekimi yapılmıştır. Ardından yatık agarlar 2 gün 37 °C bir etüvde bekletilmiş ve *L. mesenteroides* eldesi sağlanmıştır. Ardından steril öze yardımıyla lam üzerine alınan bakteri mikroskopik incelemeye tabi tutulmuştur (Şekil 2a-b). Seyreltme dilüsyonlarının hazırlanması için öncelikle üreme olan yatık agarlardan birine 2 mL peptonlu su eklenerek vortekslenmiştir. Sirke üretileceği gün içerisinde aşılacak için hazır hale getirilmiştir.

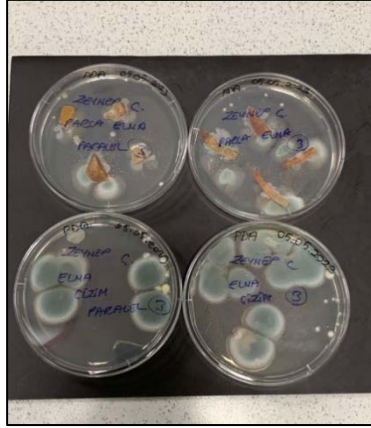


Şekil 2. (a-b): *Leuconostoc mesenteroides* mikroskop görüntüsü (x100'de büyütülmüş)

2. Elma Örneklerinden Küf İzolasyonu

Küf ve maya sayımında kullanılan PDA (Potato Dextrose Agar) hazırlanıp otoklava konduktan sonra küf izolasyonu amacıyla sirke üretiminde kullanılacak olan elmalardan kabukları kesilmeden parçalar alınarak iki tanesi PDA üzerine çizilmiş, iki tanesi PDA üzerine parça parça olacak şekilde bırakılmıştır (Şekil 3). Ardından 25°C etüvde 5-7 gün bekletilerek *P. expansum* küfü izolasyonu sağlanmış ve bu elde edilen küfler çoğaltılmak amacıyla PDA üzerine tekrardan

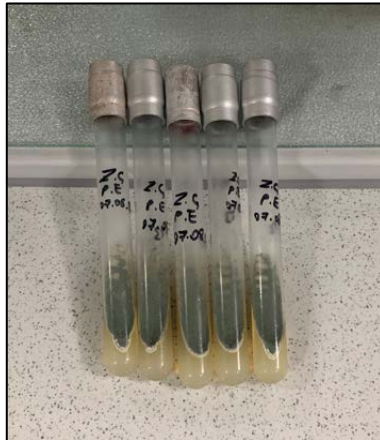
izilmiştir (şekil 4). Steril koşullarda PDA yatık agara ekim yapılmış ve sirke üretiminde sirkeye aşılmak üzere 2 mL peptonlu su karıştırılarak 10^{-1} 'e seyreltilmiş ve saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından steril bir öze yardımıyla lam üzerine alınan *Penicillium expansum* mikroskobik incelemeye tabi tutulmuştur (şekil 6).



şekil 3. PDA üzerinde elma yüzeyinden *P. expansum* remesi



şekil 4. PDA üzerinde *P. expansum* izolasyonu



şekil 5. *Penicillium expansum* saflaştırma işlemi



Şekil 6. *Penicillium expansum* mikroskop görüntüsü

3. *Leuconostoc mesenteroides*'in *Penicillium expansum* Üzerinde Antifungal Etkisinin Belirlenmesi

P. expansum büyümesine karşı *L. mesenteroides* bakterisi ile kullanılacak stratejiler denenmiştir. İzole edilen laktik asit bakterisi ve küfün gelişimini aynı ortamda izleyip laktik asit bakterisinin antifungal aktivite gösterip göstermediğini incelemek için kullanılan ilk yöntemde 4 adet erlenin içerisine 100 mL'lik peptonlu su konmuştur.

Ardından ilk erlene 1 mL *Penicillium expansum* aşılansmış 25 °C etüvde 4 gün bekletildikten sonra üzerine 1 mL laktik asit bakterisi *L. mesenteroides* eklenmiştir. 6 gün boyunca 37 derecelik etüvde bekletilmiştir. İkinci erlene 1 mL *Penicillium expansum* ve 1 mL *L. mesenteroides* aynı anda aşılansmıştır ve 10 gün boyunca 25 derecelik etüvde bekletilmiştir. Üçüncü erlene sadece küf sporu 1 mL *Penicillium expansum* eklenmiştir ve 10 gün 25 derecede saklanmıştır. Dördüncü erlene ilk olarak 1 mL *L. mesenteroides* eklenmiş 37 derecede 2 gün beklendikten sonra 1 mL *Penicillium expansum* eklenmiştir ve 25 derecede 8 gün daha bekletilmiştir. Dört erlen de toplam 10 gün farklı derecelerdeki etüvlerde bekletilmiştir. 10. günün sonunda toplam 4 erlen de etüvlerinden çıkarılıp laktik asit bakterisinin antifungal etki gösterip göstermediği incelenmiştir.

Laktik asit bakterisinin *P. expansum* küfü üzerindeki antifungal etkisini görmek için agar kuyu difüzyon yöntemi de uygulanmıştır. Steril bir ortamda MRS agar üzerine 6 mm çapında delikler açılmıştır. Bu açılan delikler içerisine 0,1 mL 10⁻¹'e seyreltilmiş *L. mesenteroides* aktarılmıştır. Bu petriyerler 37 derecede 5-6 saat inkübasyona bırakılarak *L. mesenteroides* bakterisinin aktivasyonunun

artması amaçlanmıştır. İnkubasyon sıcaklığı sonunda deliklerin kenarlarına 0,1 mL olacak şekilde 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} 'ya kadar seyreltilmiş *P. expansum* küfü drigalski yardımıyla yayılmış ve bu petriler 25 derecelik etüvlerde inübasyona bırakılmıştır. 5-7 gün sonra delikler içerisindeki *L. mesenteroides* bakterisinin oluşturduğu bakteriyosinler tarafından agarın çevresine yayılan *P. expansum* küfü etrafında bir zon oluşturarak antifungal etki gösterip göstermediği incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada *P. expansum*'un MRS'de büyüme yeteneği kanıtlanmıştır (Schillinger ve Villarreal, 2010). İn vitro antifungal aktiviteye sahip birçok LAB, bitki hastalıklarının yönetiminde etkili biyokontrol ajanları olarak önerilmiştir (Gajbhiye ve Kapadnis, 2016).

4. Sirke Üretimi

Sirkeler laboratuvar ortamında yavaş yöntem ile yeşil elma (Granny Smith, Temmuz 2023, İstanbul) ve su kullanılarak olarak üretilmiştir (Aktan ve Yıldırım, 2011). Çalışmanın başında sirkeyi üretmek üzere temin edilen elmaların yüzeyleri Potato Dextroz Agar (PDA) üzerine sürülerek *P. expansum* izole edilmiştir. Yeşil elmalar İstanbul Migros marketten temin edilmiştir ve suyla yıkandıktan sonra kabukları soyulmadan küçük parçalar halinde kesilmiştir. Daha sonra 17 adet 500 mL'lik kavanozlar 2/3'si elma olacak şekilde doldurulmuş geri kalanı su ile tamamlanarak kapatılmıştır (Şekil 7). Sirke oluşumu sırasında ortaya çıkacak gazdan dolayı kavanozlar su ile doldurulurken bir miktar boşluk bırakılmıştır.

Elma sirkeleri aerobik ve anaerobik ortamlarda olacak şekilde 2 grup halinde doğal yöntemlerle sadece elma ve su ile katkısız olarak üretilmiştir. 17 adet kavanozun 4 tanesi aerobik ortamda muhafaza edilmek üzere, kalan 12 tanesi ise anaerobik ortamda tutulmak üzere üretilmiştir. Kalan 1 adet sirke 0. gün sirkesi olarak üretilmiştir. Bunun sebebi depolama olmadığından dolayı bütün sirkelerin 0. günleri aynı baz alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Aerob-anaerob farkı yaşanmayacağı düşünülerek 0. gün bir adet üretilmiştir. 0, 7, 15 ve 30. günlerde numune alınıp mikrobiyolojik ve kimyasal analizlerin yapılması amaçlanmıştır. Anaerobik ortamda tutulan sirkelere 0, 7, 15 ve 30. günlerde yapılacak analizler esnasında hava ile teması sirkelerin mevcut ortamını bozacağı için anaerobik ortamda saklanacak her bir sirkeden 3'er adet (7.günler, 15.günler

ve 30.günler) üretilmiştir. Bu sirkeler üretildikten sonra 22 C'lik etüvlerde muhafaza edilmiştir.



Şekil 7. Sirke üretim aşaması



Şekil 8. 17 adet elma sirkesi

Aerobik ortamda bulunan sirkeler her gün kapakları açılarak cam bagetlerle karıştırılmış ortamla teması sağlanmıştır, anaerobik sirkeler kapakları açılmadan dışardan çalkalanmıştır. Anaerobik sirkeler numune alınacak günler haricinde ortamla asla temas etmemiş, analizler için numune alındıktan sonra o kavanozlar bir daha kullanılmamıştır. 7. gün analizleri için 7. gün sirkelerinin kavanozları kullanılırken 15. gün ve 30. gün sirke kavanozları depolanmalarına devam etmektedir.

Sirke üretiminden hemen ardından laktik asit bakterisi ve küf aşılama aşaması gerçekleştirilmiştir. *L. mesenteroides* peptonlu su kullanılarak vorteks yardımıyla 10^{-1} 'e seyreltilmiştir. Aynı şekilde *P. expansum* küfü de peptonlu su kullanılarak 10^{-1} 'e seyreltilmiştir. Ardından sırasıyla A Grubu sirkelerine sadece

10^{-1} seyreltilmiş *L. mesenteroides* bakterisinden 1 mL aşılanmıştır. B Grubu sirkelerine laboratuvar ortamında elmadan izole edilen 10^{-1} 'e seyreltilmiş *P. expansum* küfünden 1 mL aşılanmıştır. C Grubu sirkelerine hem *P. expansum* hem *L. mesenteroides* bakterisinden 1'er mL eklenirken, D Grubu sirkeleri kontrol sirkeleri olup içerisine bir takviye yapılmamıştır. D Grubu normal elma sirkesidir.

Bu tez çalışması sırasında sirke fermentasyonu 30 gün sürmüştür. 30. güne kadar sirkeler belirli günlerde analizlere tabi tutulmuşlardır. Gerekli kimyasal analizler yapılmış ve kalite parametreleri incelenmiştir. Burada amaç *L. mesenteroides* bakterisinin aşılandığı sirkelerde *P. expansum* küfünü inhibe ederek mikotoksin PAT üremesi ve gelişmesini engellemek veya sirke içerisinde en az oranda bulunmasını sağlamaktır. Aynı zamanda yapılan kimyasal analizler ile LAB takviyesi ile birlikte sirkenin kimyasal yapısının bozulup değişime uğrayıp uğramadığı izlenecektir.

5. Mikrobiyolojik Analizler

Sirke örneklerinde küf ve maya gelişimini izlemek amacıyla Potato Dextrose Agar (PDA) ve Yeast Extract Glucose Chloramphenical Agar (YGC) besiyeri kullanılmıştır. Sirke örneklerinden 1'er mL alınıp, 9 mL'lik peptonlu su ile dolu deney tüplerine aktarılarak 10^{-6} 'ya kadar seyreltilmiş, ardından yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Aseptik koşullarda drigalski spatülü yardımı ile yayma gerçekleştirilmiştir. Petriler 25 °C etüvlerde 5-7 gün inkübe edilmiştir.

Sirke içerisinde LAB sayımı için MRS besiyeri kullanılmıştır. Sirke örneklerinden 1'er mL alınıp, 9 mL'lik peptonlu su dolu deney tüplerine aktarılmış ve bu şekilde 10^{-6} 'ya kadar seyreltilip yayma plak yöntemi ile drigalski spatülü kullanılarak ekim yapılmıştır. Petriler 37°C 2-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Ardından mikrobiyal yük hesaplanmıştır.

6. Kimyasal Analizler

Elma sirkesi örneklerinin hepsine 0, 15 ve 30. günlerde pH, suda kuru madde miktarı (Brix), toplam asitlik, toplam kuru madde, toplam fenolik madde miktarı (TFM), toplam flavonoid, toplam antioksidan, toplam alkol miktarı ve patulin miktarı analizleri uygulanmıştır.

7. pH Analizi

Sirke numunelerinin pH değerleri oda sıcaklığında bir pH ölçer (Mettler Toledo Seven Compact) kullanılarak ölçülmüştür. Öncelikle pH metrenin kalibrasyonu yapılarak ölçümler yapılmıştır. pH ölçer elma sirkesine daldırılarak yaklaşık 1 dakika sonra okumalar yapılmıştır (Kırcı, 2017).

8. Suda Kuru Madde Analizi (Briks)

Analiz sırasında suda çözünmüş kuru madde briks değeri olarak okunmuştur. Briks değerleri, sıvı veya sulu bir numunedeki toplam çözünür katı içeriğinin yüzdesini göstermektedir (Şengün, 2020). Sirkelerin hammaddesine göre değişiklik gösterir. Suda çözünür kuru madde miktarı (briks) dijital refraktometre (Reichert Refraktometre) ile pastör pipet yardımı ile ölçülmüştür. Önce distile su ile kalibre edilip ardından elma sirkelerinin değerleri aynı şekilde refraktometrede ölçülmüştür.

9. Toplam Asitlik Tayini

Sirkede asetik asit, malik asit, laktik asit, oksalik asit gibi organik asitlerin bulunduğu, fakat bunlar arasında asetik asidin baskın olduğu ve sirkelerin tadı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Kim, 2012). Toplam asitlik tayini 10 mL'lik sirke örneklerine 20 mL distile su ve ardından 2-3 damla fenolftaleyn indikatörü damlatılarak büret kullanılarak titrimetrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan 0,1 N NaOH, bürete konuldu. Sirke ve indikatör bulunan erlen musluğun altına alınmıştır. Ardından büretin musluğu açılıp erlendeki renk dönüşümü için beklenmiş ve kullanılan NaOH miktarı kaydedilmiştir (Şekil 5) (OIV, 2000).

Hesaplama:

$$\text{Asitlikg/L} = \frac{V \times N \times E \times 1000}{M}$$

V: Harcanan NaOH hacmi (mL),

N: NaOH normalitesi,

E: Asetik asidin milieşdeğer ekivalenti,

M: Alınan örnek hacmi (mL)



Şekil 9. Toplam asitlik titrasyon analizi

10. Toplam Fenol İçeriği

Toplam fenolik madde tayini için standart olarak gallik asit stok çözeltisi hazırlanmıştır. Folin Ciocalteu yöntemi (Rossi ve Singleton, 1965) tarafından tanımlanan metot ile yapılmıştır. Folin ayıracı ile tepkimesi sonucunda oluşmuş olan mavi renk, spektrofotometrede şahit numuneye karşı 720 nm dalga boyunda okunmuştur. Bu gallik asit çözeltisinden beş farklı konsantrasyonda seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Buna bağlı olarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. 100µL sirke örneğine 0.9 mL saf su ve üzerine 4 mL 0.2 N Folin Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. Ardından 5 mL Na₂CO₃ çözeltisi (75 g/L) eklenip çözeltiler aliminyum folyo ile sarılarak karanlık bir ortamda 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilip spektrofotometrede 765 nm'de UV/Vis absorbanslar ölçülmüştür. Sonuçlar, gallik asit stok çözeltisinden elde edilen grafikte ($y=ax+b$) bulunan regresyon eşitliği kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/L olarak ifade edilmiştir. Analizler 2 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

11. Toplam Flavonoid Miktarı

Standart olarak 2,5 mg quercetin 10 mL metanol kullanılarak quercetin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Beş farklı konsantrasyonda seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir ve buna bağlı olarak kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Toplam flavonoid içeriği Lamaison ve Carnet'e (1990) göre yapılacaktır. 2 mL ekstrakt üzerine 2 mL alüminyum klorür (% 2, w/v) ilave edilip karıştırılmıştır ve ortam sıcaklığında 15 dakika tutulmuştur. Absorbans, 415 nm'de bir UV/Vis spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümde okunan absorbans değerleri quercetin stok çözeltisinden elde edilen konsantrasyonlarla oluşturulan grafikteki denklem kullanılarak sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar mg quercetin eşdeğeri (QE) / L kuru madde olarak ifade edilmiştir. Analizler 2 paralelli şekilde gerçekleştirilmiştir.

12. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Antioksidan Madde Miktarı Tayini

DPPH yöntemi ile toplam antioksidan madde miktarı tayini Brand-Williams vd. (1995)'e göre yapılmıştır. Mor renkte olan DPPH radikalinin antioksidan madde etkisiyle DPPH-H formuna indirgenmesiyle meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrede 515 nm'de ölçülmesi ve böylece süpürülen radikal miktarının hesaplanması ilkesine dayanmaktadır.

DPPH çözeltisi 6 mg DPPH'ın 250 mL metanol içerisinde çözdürülmesiyle elde edilmiştir. DPPH çözeltisi ısıya ve ışığa karşı hassas olduğundan üzeri alüminyum folyo ile sarılıp ışığı geçirmediğinden emin olduktan sonra ısı olmadan manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Çözelti hazır olduğunda 100 µL sirke örneği ekstraktına 3,9 mL 6×10^{-5} M (MeOH ile) DPPH çözeltisi ilave edilmiş ve vortekslenmiştir. 515 nm'de okunan absorbanstaki değişim, numuneleri 30 dk karanlıkta beklettikten sonra spektrofotometrede kaydedilmiştir. Kontrol olarak sirke örnekleri veya distile su yerine MeOH, kör olarak sadece MeOH kullanılmıştır. Sonuçlar, % inhibisyon şeklinde hesaplanmıştır. Analizler 2 paralelli şekilde gerçekleştirilmiştir.

$$\% \text{inhibisyon} = ((\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}) / \text{Abs}_{\text{kör}}) * 100$$

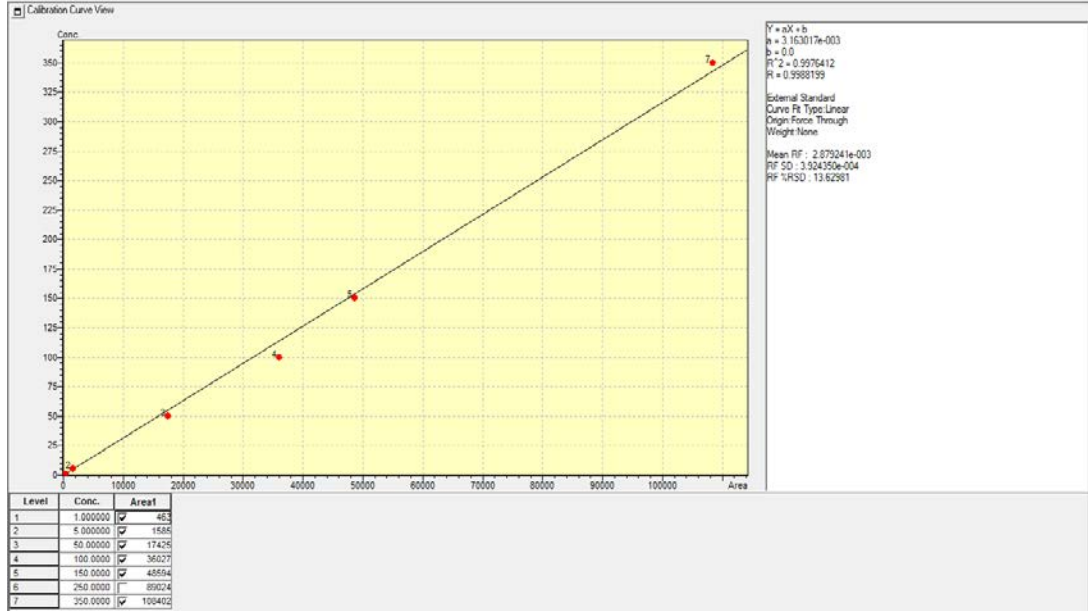
13. Toplam Kuru Madde Analizi

Elma sirkesi örneklerinden 2'şer paralel olmak üzere cam petri kapları hazırlanmıştır. Kurutmanın yapılacağı petri kapları etüvde 130°C'de sabit tartıma getirilmiştir. Ardından hassas terazi yardımıyla cam petri kaplarının darası alınıp 5 gr sirke örnekleri tartılmıştır. Daha sonra petri kapları etüve yerleştirilip 105 °C'de 3-4 saat kurumaya bırakılmıştır. Ardından desikatöre alınarak soğuduktan sonra cam petriler tekrar tartılmıştır. İlk ve son ağırlık arasındaki fark alınarak sonuçlar % olarak hesaplanmıştır (Kırcı, 2017).

$$\%Kuru Madde = \frac{[(Son kuruma tartımı - dara)]}{[(İlk brüt tartımı - dara)]}$$

14. Patulin Miktarı

Patulin analizi R-Biopharm App. Notes P250 metoduna göre yapılmıştır. 2,5 mL süzölmüş berrak olan sirke numunesi santrifuj tüpüne alınır. Üzerine 2,5 mL %2'lik asetik asit çözeltisi eklenir. 2 ml Asetonitril 1damla/saniye hızda geçirilir. Bu şekilde kolon şartlanır. Bu süre içerisinde kolonun kurumaması gerekmektedir. Kolonun tabakası üzerinde ince bir asetonitril kalınca hemen 1 mL su eklenir kolondan geçirilir. 4 mL seyreltilmiş örnek 0,5 ml/dakika akış hızında kolondan geçirilir. Akış hızı geri kazanım açısından çok önemlidir. 1ml %1'lik sodyum bikarbonat solusyonu ile tuzları ve polar matriks bileşenlerini uzaklaştırmak için yıkanır. 2 mL su geçirilerek yıkama devam edilir. Çeker ocak altında 0,5 mL dietil eter 1damla/saniye akış hızında geçirilir. Ardından 2 mL 100 Etil asetat kolondan geçirilerek tutulan toksin 1,5 mL'lik cam viale alınır. 10µl %100 Asetik asit eklenir ve 35-45 C'de azot altında kuruluğa kadar uçurulduktan sonra hemen 1 mL %0,1'lik asetik asit çözeltisi eklenir ve 20 saniye vorteksenerek çözülür. HPLC cihazında enjeksiyona verilir. Patulin analizi için kolonda alıkonma süresi yaklaşık olarak 24 dakikadır. Seyreltme Faktörü = 0,5'tir (R-Biopharm App. Notes P250).



Şekil 10. Patulin Kalibrasyon Grafiği

15. Toplam Alkol Miktarı

Etil alkol analizi için AOAC metotuna göre yapılmıştır. Sirke örneklerinin her birinden 5 mL örnek alınmıştır. Örneğin üzerine %5'lik n-Propanol çözeltisi ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. GC-FID sistemine enjekte edilmiştir. Hesaplamalar aşağıdaki formül ile yapılmıştır.

$$\text{Etil Alkol, \%}(v/v) = \frac{\text{Etil Alkol Pik Yüksekliği} / n - \text{Propanol Pik Yüksekliği}}{F}$$

F = Konsantrasyona karşı artış miktarı ve bu artışın hesaplanan eğimi

D. İstatistiksel Analiz

Yapılan analizlerden kuru madde, antioksidan, toplam fenolik madde ve flavonoid miktarı analizleri iki paralelli şekilde yapılmıştır. Sonuçlar paralellerin ortalama ve standart sapmaları halinde verilmiştir ve istatistiksel analiz ANOVA, Minitab Ver.17 kullanılarak yapılmıştır. Grup içi değerlendirmeler aynı programla TUKEY Testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

Mikrobiyal ve kimyasal analizler, sirkelerin 30 günlük fermentasyon süresince ve fermentasyon sonunda elde edilen örnekler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tangüler ve ark. yaptıkları çalışmada elma atıklarından elma sirkesinin 35 günlük fermentasyon süresine, pirinç sirkesi ile çalışan Bayram ve ark. asetik asit fermentasyonunun 28 günde tamamlandığını belirtmişlerdir. Literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında sirkenin fermentasyon süresi önceki çalışmalar ile uygundur.

A. Sirke örneklerinin kısaltma açıklamaları

Çalışmada kullanılan sirke örneklerinin çeşitleri ve içerisindekilere ait kısaltmalar Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. Sirke örneklerinin kısaltmaları

K(AE)	Kontrol Sirkesi (Aerobik)
SB(AE)	Kontrol Sirkesi + Bakteri (Aerobik)
SK(AE)	Kontrol Sirkesi + Küf (Aerobik)
SKB(AE)	Kontrol Sirkesi + Küf + Bakteri (Aerobik)
K(ANA)	Kontrol Sirkesi (Anaerobik)
SB(ANA)	Kontrol Sirkesi + Bakteri (Anaerobik)
SK(ANA)	Kontrol Sirkesi + Küf (Anaerobik)
SKB(ANA)	Kontrol Sirkesi + Küf + Bakteri (Anaerobik)

B. Sirke Örneklerinin Günlere Göre pH Değerleri

Elma sirkeleri ilk günden itibaren 7, 15 ve 30. günlerde pH değerleri rutin olarak ölçülmüştür. Aerobik ortamda üretilen sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca pH değerleri aşağıda Çizelge 3’te verilmiştir.

Çizelge 3. Sirke örneklerinin günlere göre pH değerleri.

Günler	K (AE)	SB (AE)	SK (AE)	SKB (AE)	K (ANA)	SB (ANA)	SK (ANA)	SKB (ANA)
0	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
7	3,66	3,85	3,72	3,90	3,72	3,89	4,52	3,81
15	3,59	3,81	3,47	3,38	3,52	3,52	4,17	3,35
30	3,28	3,58	3,22	3,17	3,26	3,26	3,13	3,30

Tüm sirke çeşitlerinin 0. günü aynı olduğundan 0. gün sirkesi kontrol sirkesi olarak baz alınmıştır. Kontrol 0.gün sirkesinin pH değeri 3,9 ölçülmüştür. Aerobik ortamda muhafaza edilen sirke örneklerinin 7, 15 ve 30. günlere ait pH ölçümleri sırasıyla Çizelge 3'te gösterilmiştir. Aerob ve anaerob olmak üzere iki yöntemle de üretilen sirkeler arasında 30 günlük fermentasyon sonunda pH değeri en düşük sirke 3,13 değeriyle SK(ANA), en yüksek pH değerli sirke ise 3,58 değeri SB(AE) olmuştur. Gün ilerledikçe sirke örnekleri gruplarına göre değerlendirildiğinde pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Bu durum sirke üretiminde gerçekleşen fermantasyonu doğrulamaktadır. Asetik asidin ortamdaki asitlik miktarını artırdığı kanıtlanmıştır.

Akbaş ve Cabaroğlu (2010), 12 farklı marka üzüm sirkesi örneği ile yaptıkları çalışmada pH değerleri 2,63 ile 3,27 arasında değişiklik gösterdiği görülmüştür. Elma sirkesi üretiminde pH 2.87-3.21 olarak tespit edilmiştir ve elmadaki asitlik oranının artırdığı rapor etmiştir (Budak, 2010; Budak vd., 2011; Budak, 2015). Ünal ve diğerleri (2007) Dimrit üzümleri ile yaptıkları çalışmadaki sirkelerin pH değerleri 2,68-2,85 tespit edilmiştir. Gerbi ve diğerleri, yaptıkları çalışmada 65 çeşit sirke örneğiyle şarap ve elma sirkeleri için pH sonuçları 2.63 ve 3.27 olarak bildirmişlerdir.

Tangüler vd. (2021) yaptıkları çalışmada 5 farklı elma ve atığından üretilen sirkeler için pH değerleri 3,25-3,41 aralığında belirtilmiştir. Özen (2021), geleneksel yöntemle üretilen sirkelerde 40 günlük fermentasyon sürecinde pH değerleri 4,44'ten 3,73'e kadar azaldığını bildirmiştir. Fermentasyon süresinin artmasının pH değerine etki ettiği bildirilmiştir.

Elma sirkesi üzerine yapılan başka bir çalışmada Aykın (2013), elma sirkesi ve elma sirke anasında ortalama pH sonuçları sırasıyla 4,40 ve 3,23 olarak tespit edilmiştir.

Dut sirkesi üzerine yapılan bir çalışmada meyve sirkelerinde pH ölçüm sonuçlarının 2.36-3.73 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Düşük pH değerlerinin, LAB ve buna bağlı olarak istenmeyen aroma maddelerinin üremesine engel olduğundan dolayı önem taşıdığı bildirilmektedir (Şengün ve Kılıç, 2018). Bu değerlere göre 30 günlük fermentasyon sonucunda elma sirkelerinin pH değerleri literatür ile uyumluluk göstermiştir. Sadece bakteri ilavesi olan SB(AE) ve SB(ANA) sirkeleri normal sınırların dışında kalmıştır.

Buna bağlı olarak SB(AE), SB(ANA) örneklerinden pH değerinin 3,50 üzerinde seyretmesi sirkenin içerisine aşıladığımız laktik asit bakterisinin aktivitesi sonucu olarak yorumlanabilir. SK(ANA) örneğinde 7.gün pH değeri 4,58 ölçülmüş 0.gün sirkesine göre daha fazla olduğu ve tüm günlerde alınan diğer sirke örneklerinin pH değerlerine göre daha yüksek seyrettiği görülmüştür. Sirkenin içerisine eklenen küfün oksijen ile temasının kesilmesi fermantasyonu yavaşlatmış olabileceğine işaret etmiştir.

C. Sirke Örneklerinin Toplam Asitlik Değerleri

Toplam asitlik değeri fermantasyon süresi boyunca 7, 15 ve 30. günlerde ölçülmüştür. Tüm sirke çeşitlerinin toplam asitlik değerleri % şeklinde aşağıdaki Çizelge 4’te verilmiştir.

Çizelge 4. Sirke örneklerinin günlere göre toplam % asitlik değerleri.

Günler	K (AE)	SB (AE)	SK (AE)	SK (AE)	K (ANA)	SB (ANA)	SK (ANA)	SKB (ANA)
0	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
7	1,2	1,02	0,96	1,2	1,44	0,11	0,11	0,14
15	1,92	2,46	1,56	3,42	1,74	1,08	1,08	1,38
30	3,98	3,18	2,1	4,26	3,92	5,88	5,28	4,14

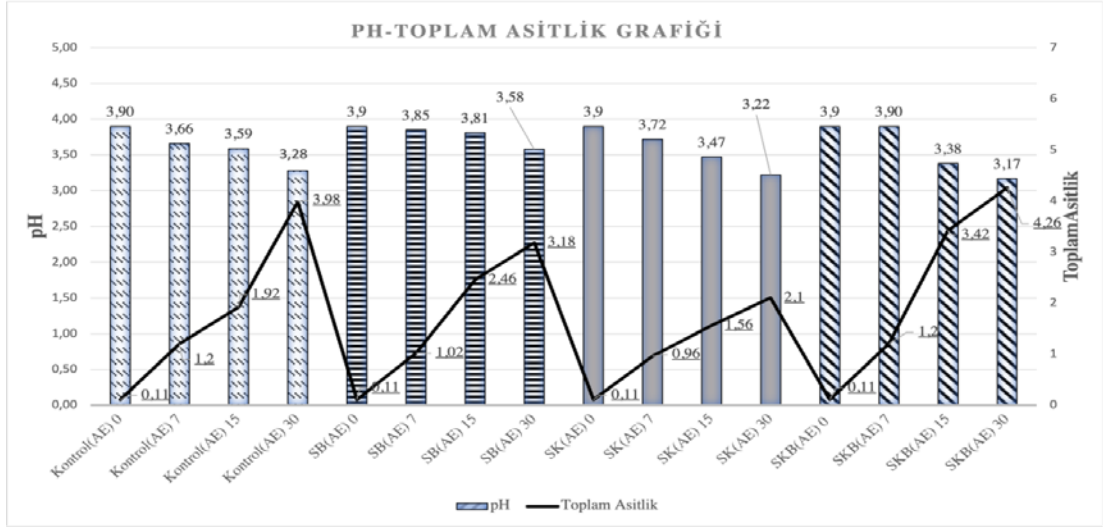
0. gün toplam asitlik değeri %0,11 ölçülmüştür. 30 günlük fermentasyon sırasında sirkelerin % asitlik değerlerinde depolama günü arttıkça düzenli bir şekilde artış izlenmiştir. Depolama sonunda en yüksek asit içeriği bulunduran

sirkeler 5,88 ve 5,28 değerleriyle SB(ANA) ve SK(ANA) numuneleri olmuştur. Fermentasyon sonlandığında en düşük asit içeriği gösteren sirkenin 2,1 değeriyle SK(AE) sirkesi olduğu gözlenmiştir. Sirkelerin pH değerleri azaldıkça toplam asitliğin arttığı kanıtlanmıştır.

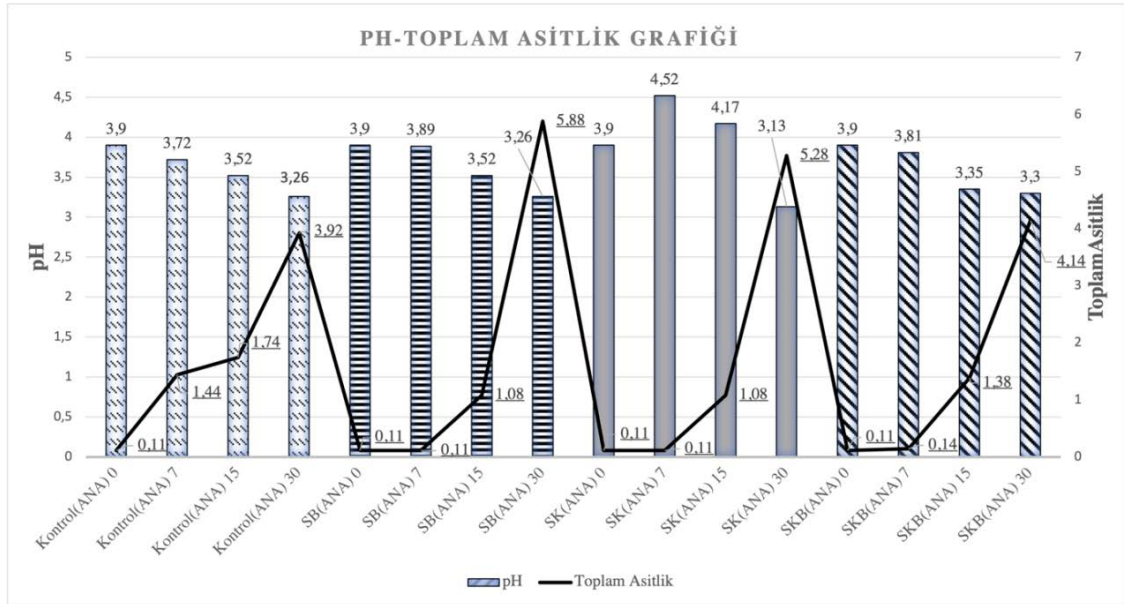
Ünal (2007), dimrit üzümlelerinden üretilen sirkelerin toplam asitlik miktarları 4,14-6,59 g/100 mL bulunmuştur. Gerbi vd. (1998), çalıştıkları araştırmada, sirkedeki toplam asitlik miktarını 6,6 g/L olarak rapor etmişlerdir. Çalışmamızdaki sirkelerin % asitlik değerleri Gerbi vd. tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile uygun olduğu görülmüştür. Öte yandan Ünal (2007) tarafından yapılan çalışmadaki değerler birim bakımından g/L'ye çevrildiğinde çalışmamızdaki değerler verilen sınırların altında kaldığı gözlenmiştir. Bayram ve ark. çalıştıkları pirinç sirkesi üretiminde fermantasyonun 27. gününde toplam asitlik oranını 59.8 g/L belirtilmiştir.

9TS 1880 EN 13188 sirke standardına ek olarak çıkan, Nisan 2004 tarihli tadilin Türkiye başlıklı sapmasında ülkemizde üretilen sirkelerin toplam asit içeriğinin (suda serbest asetik asit cinsinden) 40 g/L'den (4 g/100 mL) az olmamalıdır" denilmektedir

Çalışmamızda üretilen sirkelerin asitlik değerleri belirlenen standardın altında kalmıştır. Bu çalışmada üretilen elma sirkeleri kendi içlerinde kıyaslanacak olursa içeriklerinden dolayı farklı pH ve toplam asitlik değerleri göstermişlerdir. 30. günün sonunda SK(AE) sirkesi diğer sirkelerin değerlerine kıyasla oldukça düşük kalmıştır. Anaerobik ortamda muhafaza edilen sirkeler aerobik ortamda bulunan sirkelere göre daha yüksek toplam asitlik değerleri göstermiştir. Aynı zamanda elma sirkelerinin 30 günlük pH değerleri azılırken % asitlik değerleri benzer oranlarda artış göstermiştir. Aerobik ve anaerobik elma sirkelerinin 0, 7, 15 ve 30.günlerine ait pH ve toplam asitlik değerlerinin bağlantısı Şekil 11 ve Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 11. Aerob sirke örneklerinin pH-Toplam Asitlik Grafiği



Şekil 12. Anaerob sirke örneklerinin pH-Toplam Asitlik Grafiği

Gün bazında bakıldığında sirke türlerinin hepsinde fermentasyon süresi arttıkça pH değerinin azaldığı buna bağlı olarak toplam asitlik değerlerinin arttığı kanıtlanmıştır. Örneklerin 1.gün toplam asitlik değerleri 0,11 g/L iken 30.günün sonuna 4,26 g/L değerine kadar artmıştır. Fermentasyon sırasında oluşan laktik asitten dolayı pH değerleri düşüş yaşadığı söylenebilir. SB(AE) sirkesinde diğerlerinden farklı olarak laktik asit bakterisinin aktivitesi sonucu pH değeri çok azalmamıştır. *L. mesenteroides* bakterisinin optimum pH'ı 5,5-6,5'tir. Bu aralıkta hayatta kalma, üreme ve gelişme yetenekleri oldukça fazladır. SB(AE) sirkesinin pH değerinin yavaş bir şekilde azalmasının sebebi olarak içerisine aşılana *L. mesenteroides* bakterisinin optimum pH değeri olarak açıklanabilir.

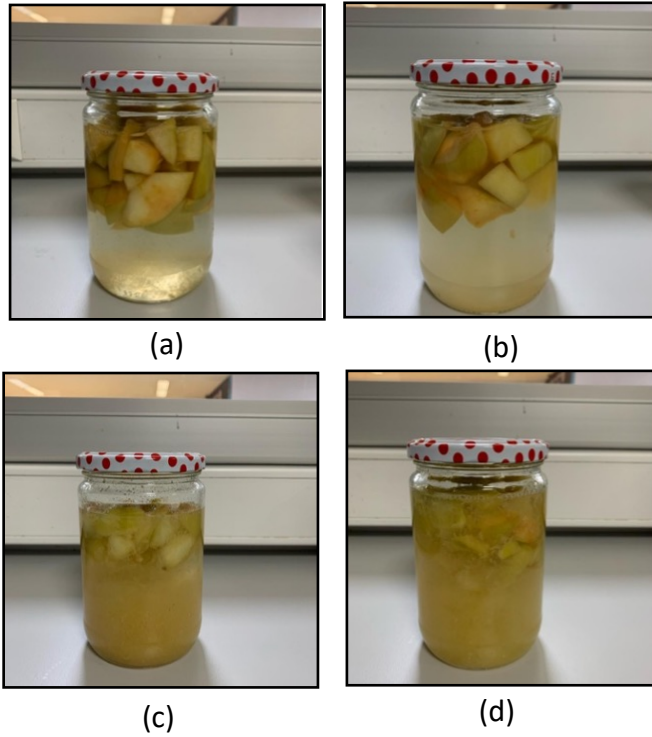
Sirkelerin fermentasyon süresi arttıkça pH değerinin azalmasıyla toplam asitliğin artması beklenen bir durumdur. Ancak SK(ANA) sirkesinde 0.günden 7.güne kadar olan pH değerinde artış izlenmiştir. Bu durum sirkenin içerisine aşıl原因 *Penicillium expansum* küfünün oksijensiz ortamda gösterdiği davranış olabileceği düşünülmüştür.

D. Sirke Örneklerinin Suda Kuru Madde (Briks) Değerleri

Tüm sirke çeşitlerinin suda kuru madde değerleri briks cinsinden aşağıdaki Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Sirke örneklerinin günlere göre briks değerleri

Günler	K (AE)	SB (AE)	SK (AE)	SK (AE)	K (ANA)	SB (ANA)	SK (ANA)	SKB (ANA)
0	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
7	2,3	2,1	2,3	1,7	3,1	1,6	2,9	3,0
15	1,7	2,0	2,7	1,8	3,2	3,2	3,9	3,1
30	1,8	1,9	2,9	1,9	3,1	3,6	3,9	3,8



Şekil 13. (a): 30 günlük fermentasyon sonunda K(ANA), (b): SB(ANA), (c): SK(ANA), (d): SKB(ANA).

Sirkelerin briks değerleri 0.günden 30.güne kadar belirli günlerde olęlmŖtur. 30 günlük fermentasyon sonunda en yüksek briks değerine sahip sirkeler anaerobik ortamda muhafaza edilen sirkeler olmuŖtur. SK(ANA) ve SKB(ANA) sirkeleri 3,9 ve 3,8 değerleriyle en yüksek briks değerini gstermiŖlerdir. 30 günlük fermentasyon süreci sonlanırken 30. gün anaerobik sirkelerin görüntüleri Ŗekil 13'te verilmiŖtir. Anaerobik sirkelerin suda kuru madde değerlerinin yüksek çıktığı tabloyu destekleyen bi Ŗekilde K(ANA), SB(ANA), SK(ANA) ve SKB(ANA) sirkeleri sırasıyla verilmiŖtir. SK(ANA) ve SKB(ANA) sirkelerinde son durumda suda çözünmeyen kuru madde oranı oldukça yüksektir. *P.expansum* küfü elmayı rtmŖ ve suda çözünemediği için suyu bulanık hale getirmiŖtir.

Literatüre bakıldığında yapılan bir alıŖmada dut sirkesinin ev sirkesi ve ticari sirke bakımından briks değerleri sırasıyla 5,60 ve 3,50 olarak bildirilmiŖtir (Ŗengn ve Kılıç, 2018).

Sirkenin suda çözünen kuru maddesi üzerine bildirilen değerlerde; refraktometrede 5,33 briks olarak bildirmiŖtir (KadaŖ, 2011), beyaz dut sirkesi ile yaptıkları alıŖmada suda çözünen kuru maddesi 3,10 briks olarak bildirilmiŖtir (Budak, 2015). Tangüler vd. yaptıkları alıŖmada elma sirkesinde ollen briks değerleri 4,8-5,4 arasında belirtilmiŖtir (Tangüler ve ark., 2021).

alıŖmamızda yapılan analizler sonucunda elde ettiğimiz değerlerin literatürdeki diğer verilerden içerik farklılığı bakımından daha dŖk seyrettiği grlmŖtir.

E. Sirke rneklerinin Antioksidan Analiz Değerleri

Tüm sirke eŖitlerinin antioksidan analizi değerleri % inhibisyon cinsinden aŖaęıda verilen çizelgelerde belirtilmiŖtir. Aerobik ortamdaki sirkelerin sonuçları izelge 6, anaerobik ortamdaki sirkelerin sonuçları izelge 7'de verilmiŖtir.

Çizelge 6. Aerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük antioksidan değerleri.

Örnek Zaman (gün)	K (AE)	SB (AE)	SK (AE)	SKB (AE)
0	2,16±2,59 ^{Ab}	2,16±2,59 ^{Ad}	2,16±2,59 ^{Ac}	2,16±2,59 ^{Ad}
7	23,92±2,64 ^{Ca}	84,76±0,66 ^{Aa}	87,75±0,92 ^{Aa}	73,26±4,75 ^{Ba}
15	22,78±2,55 ^{Ca}	62,02±5,37 ^{Ab}	49,63±0,64 ^{ABb}	46,20±1,15 ^{Bb}
30	15,43±0,82 ^{Ca}	45,32±1,76 ^{Ac}	48,91±3,06 ^{Ab}	27,96±2,47 ^{Bc}

A-C: Aynı satırda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

a-d: Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

Çizelge 7. Anaerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük antioksidan değerleri.

Örnek Zaman (gün)	K (ANA)	SB (ANA)	SK (ANA)	SKB (ANA)
0	2,16±2,59 ^{Ac}	2,16±2,59 ^{Ac}	2,16±2,59 ^{Ad}	2,16±2,59 ^{Ac}
7	47,19±0,92 ^{Cab}	76,44±4,22 ^{Aa}	58,03±0,65 ^{Bb}	76,72±1,59 ^{Aa}
15	57,95±0,97 ^{Aa}	8,40±0,8 ^{Bbc}	79,47±1,14 ^{Aa}	52,34±4,73 ^{Ab}
30	21,86±1,64 ^{Abc}	28,54±54 ^{Ab}	17,77±5,01 ^{Ac}	36,55±5,66 ^{Ab}

A-C: Aynı satırda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

a-d: Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

Çalışmamızdaki sirke örneklerinde antioksidan değerlerinin fermentasyon süresi arttıkça 30. güne doğru azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki sirkeler kendi aralarında karşılaştırıldığında tüm sirkelerin 7.gününde büyük bir artış izlenmiştir. Yalnızca SB(ANA) sirkesinin 15.gününde anlamsız bir düşüş tespit edilmiştir. Fermentasyon sonunda elma sirkeleri içerisinde en yüksek antioksidan değerine sahip örnek 48,91 sonucu ile SK(AE) olmuştur. SB(AE) ve SK(AE) örneklerinin diğer sirkelere göre yüksek antioksidan değerine sahip olduğu görülmüştür. Kontrol sirkesi ile kıyaslandığında 30.gün antioksidan değeri 15,43 iken SB(AE) 45,32, SK(AE) 48,91 değeriyle normal elma sirkesinin 3 katı kadar fazla çıkmışlardır. Bu durum aerobik ortamda sirke içerisinde küf ve laktik asit bakterisinin davranışı ile açıklanabilir. Anaerobik ortamdaki sirkeler normal elma

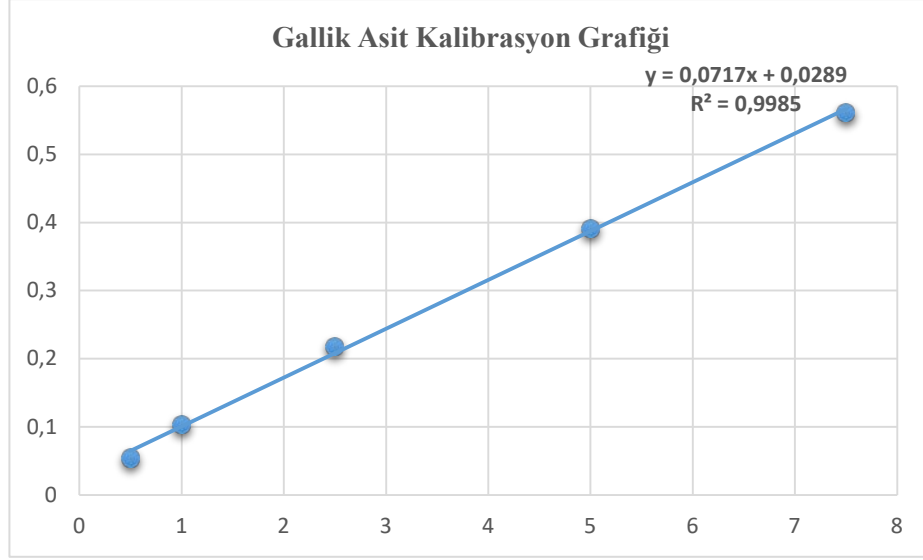
sirkesinden çok farklı çıkmamışlardır. Oksijenli ve oksijensiz ortamda bakteri ve küfün aktivitesi farklı olmuştur.

Yapılan bir çalışmada DPPH yönteminde en yüksek antioksidan kapasitenin nar sirkesinde olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada en düşük antioksidan kapasitenin elma sirkesinde olduğu rapor edilmiştir. Antioksidan kapasitenin nar sirkesi için 79,5-1272, elma sirkesi için 2,5-47,5 değerleri bildirilmiştir (Konuş vd. 2020).

Başka bir çalışmada sirkenin antiradikal aktivitesi incelendiğinde fermentasyon sonunda %41,01 olarak bulunmuştur (Hallaç vd. 2009). Literatür çalışmalarının sonuçlarından, antioksidan değerlerinin de toplam fenolik madde miktarında olduğu gibi çeşit, üretim tekniği ve depolama süresine göre değişiklik gösterdiği anlaşılmaktadır. Çalışmamızda fermentasyon sonucu elde edilen DPPH antioksidan değerleri Konuş vd. tarafından bildirilen sınırlara uygun çıkmış, Hallaç vd. yapılan çalışmada bildirilen sınırlardan düşük bulunmuştur.

F. Sirke Örneklerinin Toplam Fenolik Madde Değerleri

Sirke numunelerinin absorbans değerleri gallik asit kalibrasyon eğrisine göre mg gallik asit eşdeğer/L şeklinde ifade edilmiştir (mg GAE/L). Kalibrasyon grafiği Şekil 14'te verilmiştir. Regresyon değeri (R^2) 0,9985 olarak bulunmuştur. Gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen $y = 0,0717x + 0,0289$ denkleminde okunan absorbans değerleri denklemdaki 'y' yerine yazılarak konsantrasyon sonuçları hesaplanmıştır. Sirke örneklerinin 0.günden 30.güne kadar olan toplam fenolik madde değerleri Çizelge 8 ve Çizelge 9'da verilmiştir.



Şekil 14. Gallik Asit Kalibrasyon Grafiği ve Denklemi

Çizelge 8. Aerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük fermentasyon sırasında fenolik madde değerleri

Örnek Zaman (gün)	K (AE)	SB (AE)	SK (AE)	SKB (AE)
0	36,4±0 ^{Ac}	36,4±0 ^{Ab}	36,4±0 ^{Ab}	36,4±0 ^{Ac}
7	48,95±0 ^{Bb}	230,26±25,63 ^{Aa}	194,69±22,67 ^{Aa}	184,93±12,82 ^{Ab}
15	164,71±0 ^{Da}	225,38±4,93 ^{Ba}	190,51±2,95 ^{Ca}	272,1±9,85 ^{Aa}
30	214,08±0 ^{Ad}	38,48±8,87 ^{Bb}	59,15±3,06 ^{Bb}	45,46±10,84 ^{Bc}

A-C: Aynı satırda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p < 0,05$)

a-d: Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p < 0,05$)

Çizelge 9. Anaerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük fermentasyon sırasında fenolik madde değerleri

Örnek Zaman (gün)	K (ANA)	SB (ANA)	SK (ANA)	SKB (ANA)
0	36,4±0 ^{Ab}	36,4±0 ^{Ab}	36,4±0 ^{Ab}	36,4±0 ^{Ab}
7	36,4±0 ^{Ab}	39,88±2,7 ^{Ab}	16,29±4,76 ^{Ab}	11,53±0 ^{Ac}
15	202,36±13,8 ^{BCa}	164,71±0 ^{Ca}	360,66±34,51 ^{Ab}	267,22±4,93 ^{Ba}
30	215,50±2,96 ^{Ab}	48,94±0,05 ^{Bb}	14,32±0 ^{Bb}	37,09±2,96 ^{Bb}

A-C: Aynı satırda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p < 0,05$)

a-b: Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p < 0,05$)

0.gün sirkeleri her sirkede aynı olduğundan istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Sirkenin içerdiği diğer bileşiklerde olduğu gibi fenolik bileşenlerde hammadde çeşidine, işleme tipi ve işleme aşamasına göre büyük farklılıklar göstermektedir. K(AE) sirkesi hariç diğer sirkelerde bulunan toplam fenolik madde miktarının fermentasyonun 30. gününde oldukça azaldığı tespit edilmiştir. SB(AE), SK(AE) ve SKB(AE) sirkelerinin 7.günlerinde fazla artış meydana gelmiştir. 15.günde K(AE) sirkesi de diğer aerob sirkeler gibi fazla artış göstermiştir. Aerobik ve anaerobik sirkelerde 30. gün fenolik madde değerleri normal elma sirkesine göre düşüş göstermiş, bu durum da dışarıdan içerisine ilave edilen canlı mikroorganizmaların fenolik maddeye etkisi olarak açıklanabilir.

Morales vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada fenolik madde değerleri 399-414 mg/L arasında değerler elde edilmiştir. Depolama şartlarına bağlı olarak sirkede fenolik madde miktarı değişkenlik gösterebilmektedir (Samanidou vd., 2001).

Bayram ve ark. elma sirkelerinde toplam fenolik madde miktarının 236-693 mg GAE/L ve üzüm sirkelerinin arasında olduğunu bulmuşlardır. Benzer şekilde Alonso ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise toplam fenolik madde Sherry sirkesinde 200-1000 mg GAE/L aralığında belirlenmiştir.

Tangüler vd. (2021) tarafından elma atıklarından üretilen sirkeler ile yapılan çalışmada fenolik madde miktarı 259.8-387.1 mg GAE/L arasında belirlenmiştir. Çalışmamızdaki kontrol sirkeleri Tangüler (2021) çalışmasındaki değerlere uygunluk göstermiştir.

Budak (2012) çalışmasında dut suyu, dut sirkesi ve dut şarabının fenolik madde değerleri sırasıyla 477.83 mg GAE/L, 972.71 mg GAE/L ve 609.17 mg GAE/L bildirilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz elma sirkesi fenolik madde değerleri duttan oluşan ürünlere kıyasla düşük kalmıştır. Bundan dolayı sirkelerin fenolik bileşik içeriği hammadde ve yöntemden etkilenmektedir.

Çalışmada üretilen sirkelerin fenolik madde değerleri, içerik ve depolama farklılıklarından kaynaklı olarak 11,53 mg/L-360,66 mg/L değerleri arasındadır. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada elde ettiğimiz fenolik madde değerleri yapılan

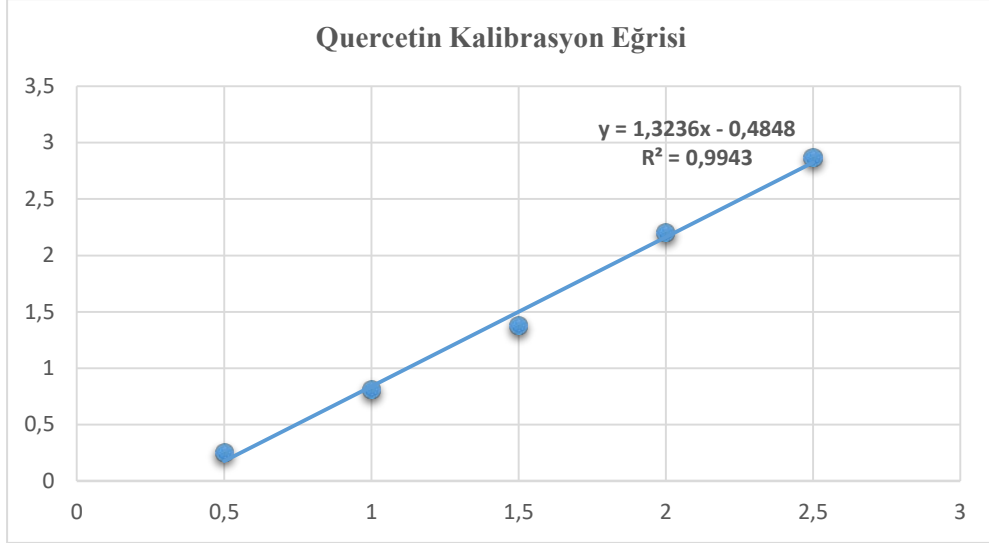
çeşitli çalışmalarla kıyaslandığında bildirilen değerlerden düşük olduğu gözlenmiştir. Bayram ve ark. ve Alonso ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda bildirilen değerler ile kısmen uygundur. Depolama gününün artmasıyla fenolik madde içeriğinde düşüş gözlenmiştir. Bunun sebebinin farklı çeşit elmalar, fermentasyon çeşidi ve süresi, ayrıca sirkenin içerisine aşılana küf ve bakterinin anaerobik ortamda gösterdiği aktivite olduğu düşünülebilir. Özellikle küf ve bakteri aşılana sirkelerin 15. günlerinde artış, 30.günlere doğru düşüş gözlenmiştir.

Ek olarak antioksidan kapasitenin, flavonoid miktarı (Turgut and Seydim, 2013) ve fenolik madde (Bakır, 2014) miktarı ile paralel olarak artışlar gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda antioksidan aktivite ve fenolik madde değerleri sirkenin fermentasyonu sonunda benzer günlerde artış benzer günlerde düşüş gösterdiği kanıtlanmıştır. Fermentasyon süresi arttıkça değerlerin azaldığı görülmüştür.

G. Sirke Örneklerinin Flavonoid Analizi Sonuçları

Doğal elma sirke numunelerinin absorbansları quercetin kalibrasyon eğrisine göre mg/L şeklinde ifade edilmiştir (mg QE/L). Quercetin kalibrasyon grafiği Şekil 15'te verilmiştir. Oluşturulan kalibrasyon grafiğinin Regresyon değeri (R^2) 0,9943 bulunmuştur. Quercetin asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen $y = 1,3236x - 0,4848$ denkleminde okunan absorbans değerleri denklemdaki 'y' yerine yazılarak konsantrasyon sonuçları hesaplanmıştır. Tüm sirke çeşitlerinin toplam fenolik madde değerleri cinsinden aşağıdaki Çizelge 10 ve Çizelge 11'de verilmiştir.



Şekil 15. Quercetin Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 10. Aerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük flavonoid analiz değerleri.

Örnek Zaman (gün)	K (AE)	SB (AE)	SK (AE)	SKB (AE)
0	57,17±0,21 ^{Ac}	57,17±0,21 ^{Ad}	57,17±0,21 ^{Ac}	57,17±0,21 ^{Ad}
7	67,6±1,38 ^{Bc}	92,26±1,33 ^{Ac}	56,5±0,91 ^{Cc}	88,34±1,98 ^{Ac}
15	105,19±2,07 ^{Cb}	132,69±0,69 ^{Bb}	84,82±1,82 ^{Da}	159,8±0,37 ^{Aa}
30	125,62±4,59 ^{Ca}	172,69±4,48 ^{Aa}	75,26±0,16 ^{Db}	149,8±0,96 ^{Bb}

A-C: Aynı satırda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p < 0,05$)

a-b: Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p < 0,05$)

Çizelge 11. Anaerobik ortamdaki sirke örneklerinin 30 günlük flavonoid madde değerleri

Örnek Zaman (gün)	K (ANA)	SB (ANA)	SK (ANA)	SKB (ANA)
0	57,17±0,21 ^{Ab}	57,17±0,21 ^{Ac}	57,17±0,21 ^{Ab}	57,17±0,21 ^{Ac}
7	76,13±1,27 ^{Ba}	67,09±1,35 ^{Bb}	132,01±5,28 ^{Ba}	83,35±7,42 ^{Ab}
15	73,9±0,04 ^{Ca}	80,78±0,16 ^{Ca}	146,09±4,91 ^{Aa}	116,02±3,41 ^{Ba}
30	62,08±3,31 ^{Bb}	72,43±3,31 ^{Bb}	144,96±9,72 ^{Aa}	80,93±0,26 ^{Bb}

A-C: Aynı satırda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p < 0,05$)

a-b: Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p < 0,05$)

0.gün sirkeleri her sirkede aynı olduğundan aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Günlere göre aerob sirkelerin flavonoid değerlerinin kıyasında SK(AE) sirkesinin flavonoid değerleri diğer sirkelere göre düşük bulunmuştur. K(AE), SB(AE) ve SKB(AE) sirkelerinin 30 günlük fermentasyon sırasında düzenli bir flavonoid artışına sahip olduğu görülmüştür. İçerisine küf enjekte edilen SK(AE) sirkesi düzensiz bir grafiğe sahiptir. Anaerob ortamda muhafaza edilen sirkelerin 30.günde flavonoid değerleri düşmüştür. Aerob sirkelerden farklı olarak ortamda oksijen yetersizliğinde sirkelerde bakteri ve küfün davranışları bu duruma sebebiyet vermiş olabilir. Çalışmada üretilen elma sirkelerinin flavonoid değerleri 57,17 mg/L-159,8 mg/L aralığında seyretmiştir.

Özen, 2021 sirke ile yaptığı çalışmada flavonoid değerleri 0.gün 299,65 mg/L, 30.gün 201,76 mg/L değerine düşmüştür. Özen, sirkelerin flavonoid değerinin ilk bir hafta düzenli şekilde arttığını bildirmiş. 7.gün 305,65 mg/L değerine kadar yükselmiş 40 günlük fermentasyonun sonunda 201,76 mg/L değerine kadar oransal şekilde düşüşler gözlenmiş. Flavonoid değerlerinden günlere göre dalgalanmalar olduğunu bildirmiştir. 30 günlük elma sirkeleri ile kıyaslandığında günlere göre dalgalanmalar yaşanması ve ve fermentasyon sonunda flavonoid değerlerindeki düşüş bakımından Özen (2021) benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz değerler belirtilen sınırların altında kalmıştır.

H. *Leuconostoc mesenteroides*'in *Penicillium expansum* Üzerinde Antifungal Etkisinin Belirlenmesi

100 mL peptonlu su doldurulan erlenlerin içerisinde farklı günlerde 1 mL *Penicillium expansum* ve 1 mL *L. mesenteroides* aşılama ile *Penicillium expansum* küfünün farklı ortamlarda gösterdiği reaksiyon incelendi. Laktik asit bakterisinin ortama daha önceden eklenip ortamda baskın hale gelmesinin ardından *P. expansum* küfünün ortama ilave edilmesi küf yoğunluğunu oldukça azaltmıştır.

Diğer erlenlerde gözlemlenen küf yoğunluğu, laktik asit bakterisinin ortama sonradan dahil olması ve küfe göre güçsüz kalması sonucunda oldukça fazla çıkmıştır. Küf ve bakteriyi aynı anda aşıladığımız peptonlu su Şekil'deki soldan ikinci erlendirdir. Laktik asit bakterisi olan *L. mesenteroides* küfü tamamen inhibe

edemese de kısmen azaltmıştır. Fakat maksimum etki bakterinin önce aşılana geliştiği erlenden alınmıştır.



Şekil 16. Peptonlu su ortamında *Leuconostoc mesenteroides* bakterisi varlığında *Penicillium expansum* küfünün gelişimi

İ. Sirke Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizleri

Sirke örnekleri fermentasyon sonuna kadar belirli günlerde mikrobiyolojik analizlere tabi tutulmuştur. Seyreltme işlemleri, 9 mL'lik peptonlu su dolu deney tüplerine 1mL *Penicillium expansum* ve *L. mesenteroides* eklenmesi ve vorteksenerek diğer tüplere de aynı işlemin uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 10^{-6} seyreltmeye kadar devam etmiştir. PDA, YGC ve MRS agar kullanılarak ekimler gerçekleştirilmiştir. İçerisine laktik asit bakterisi aşılana sirkeler MRS agara ekilmiştir. Aerobik sirkelerin MRS agar üzerinde mikrobiyolojik sayımı Çizelge 12'de, anaerobik sirkelerin MRS agar üzerinde bakteri sayımı Çizelge 13'te verilmiştir. İçerisine *Penicillium expansum* küfü aşılana sirkeler PDA ve YGC agara ekilmiştir. Hem laktik asit bakterisi hem *Penicillium expansum* küfü ile aşılana sirkeler PDA, YGC ve MRS ağara ekilmiş ve küf yoğunluğu günlere göre izlenmiştir. Aerobik ortamda muhafaza edilen sirkelerin günlere göre maya-küf sayımı Çizelge 14'te, anaerobik sirkelerin maya-küf sayımı Çizelge 15'te verilmiştir.

Çizelge 12. Aerobik sirkelerin depolama sırasındaki MRS toplam bakteri sayıları (log KOB/mL)

Örnek/ Zaman (gün)	K(AE)	SB(AE)	SKB(AE)
0	0,00±0,00 ^{Cd}	8,52±0,04 ^{Ab}	5,04±0,11 ^{Bd}
7	7,77±0,03 ^{Bb}	7,82±0,04 ^{Bc}	8,43±0,07 ^{Ab}
15	7,18±0,03 ^{Bc}	7,25±0,09 ^{Bd}	7,92±0,01 ^{Ac}
30	8,45±0,1 ^{Ba}	10,37±0,23 ^{Aa}	10,78±0,1 ^{Aa}

Çizelge 13. Anaerobik sirkelerin depolama sırasındaki MRS toplam bakteri sayıları (log KOB/mL)

Örnek/ Zaman (gün)	K(ANA)	SB(ANA)	SKB(ANA)
0	0,00±0,00 ^{Cc}	8,52±0,04 ^{Aa}	5,04±0,11 ^{Bd}
7	7,78±0,09 ^{Ca}	7,92±0,02 ^{Aa}	7,48±0,03 ^{Ba}
15	6,1±0,21 ^{Ab}	6,32±1,28 ^{Aa}	6,8±0,09 ^{Ab}
30	8,36±0,19 ^{Aa}	6,38±0,22 ^{Ba}	6,3±0,11 ^{Bc}

Çizelge 14. Aerobik sirkelerin depolama sırasındaki PDA toplam maya-küf sayıları (log KOB/mL)

Örnek / Zaman (gün)	K(AE)	SK(AE)	SKB(AE)
0	2,72±0,23 ^{Bb}	3,56±0,00 ^{ABa}	3,75±0,27 ^{Ab}
7	7,58±0,11 ^{Aa}	3,32±4,7 ^{Ba}	0,00±0,00 ^{Cc}
15	7,63±0,01 ^{Ba}	6,34±0,12 ^{Ca}	8,31±0,03 ^{Aa}
30	7,38±0,07 ^{Aa}	5,95±0,00 ^{Ba}	0,00±0,00 ^{Cc}

*SKB(AE) sirkesinin 0.gününden itibaren sayımlarındaki artış toplam mayayı ifade etmektedir. 0.günden itibaren SKB(AE) sirkesinde küf gelişimine rastlanmamıştır.

A-C: Aynı satırda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

a-d: Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

Çizelge 15. Anaerobik sirkelerin depolama sırasındaki PDA toplam maya-küf sayıları (log KOB/mL)

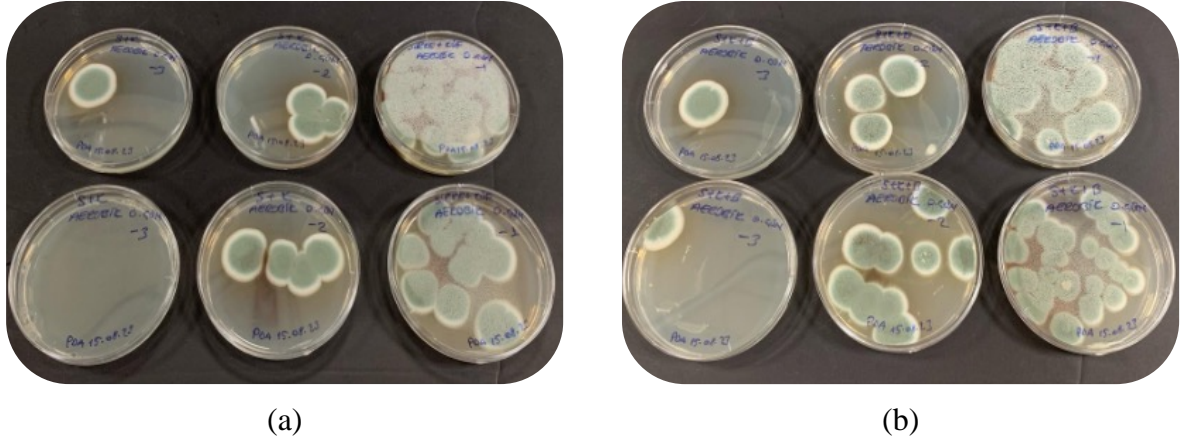
Örnek/ Zaman (gün)	K(ANA)	SK(ANA)	SKB(ANA)
0	3,49±0,09 ^{Bc}	3,56±0,00 ^{Bb}	3,75±0,27 ^{Ac}
7	5,18±0,09 ^{Abc}	6,78±0,75 ^{Aab}	6,34±0,12 ^{Ab}
15	6,3±0,49 ^{Ab}	4,03±5,7 ^{Bb}	7,65±0,03 ^{Aa}
30	9,97±0,74 ^{Aa}	7,46±0,03 ^{Ba}	0,00±0,00 ^{Cd}

*SKB(ANA) sirkesinin 0.gününden itibaren sayımlarındaki artış toplam mayayı ifade etmektedir. 0.günden itibaren SKB(ANA) sirkesinde küf gelişimine rastlanmamıştır.

A-C: Aynı satırda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

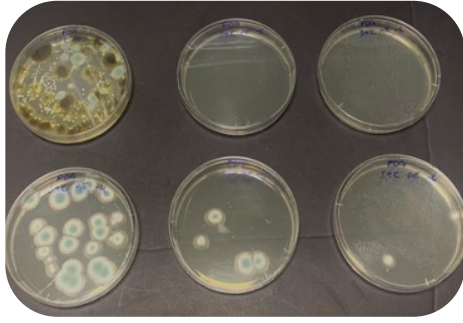
a-d: Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

30 günlük depolama sürecinde MRS agar kullanılarak K(AE), SB(AE), SKB(AE), K(ANA), SB(ANA) ve SKB(ANA) elma sirkeleri 0, 7, 15 ve 30. günlerinde mikrobiyolojik analize tabi tutulmuştur. MRS agar petripleri 37 derecelik etüvde 2 gün boyunca tutulmuştur. K(AE), SB(AE), K(ANA) ve SB(ANA) örneklerinde 0 günden 30. güne kadar MRS agarda sayımı yapılan bakteri sayısı artmıştır. Bu örneklerde, sirkenin gün sayısı arttıkça mikrobiyal yük artmıştır. Sirkelerin bazı günlerde az da olsa mikrobiyal yükünün azalması gün sayısı arttıkça *L. mesenteroides* bakterisi ile aynı zamanda *Penicillium expansum* küfünün de gelişmesi ve bu durumun bakterinin gelişmesini ve üremesini yavaşlatması olarak açıklanabilir. PDA agar kullanılarak K(AE), SK(AE), SKB(AE), K(ANA), SK(ANA) ve SKB(ANA) sirkeleri toplam maya-küf sayımı için analize tabi tutulmuşlardır. K(AE) sirkesinde küf gelişmesinden daha yoğun maya üremesi izlenmiştir. SK(AE) sirkesinin içerisine elmadan izole edilen *P.expansum* küfü aşılandığından dolayı oldukça fazla küf yoğunluğu izlenmiş, SK(ANA) sirkelerinde ise küf gelişimi oksijensiz ortamda yavaşlamış ve oksijen yetersizliğinden durmuştur. Depolama günü arttıkça SKB(AE) sirkesinde laktik asit bakterisi küf gelişimini yavaşlatmış ve durdurmuştur. SKB(ANA) örneğinde hem oksijensiz ortamdan hem de laktik asit bakterisi ilavesinden dolayı küfün gelişme imkanı daha da zayıflamış ve sifıra inmiş, maya üremesi devam etmiştir. Mikrobiyolojik analiz sonucunda mikrobiyal yük hesaplandığında *L. mesenteroides* bakterisinin antifungal etkisi görülmüştür.

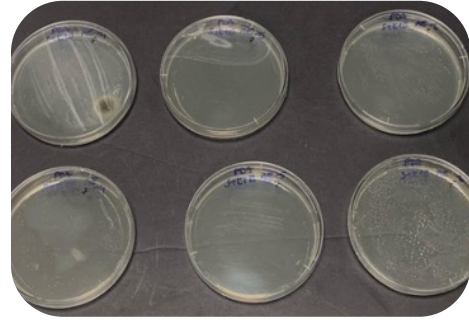


Şekil 17. (a): SK(AE) sirkesinin 0.gün PDA ekim sonucu, (b): SKB(AE) sirkesinin 0.gün PDA ekim sonucu.

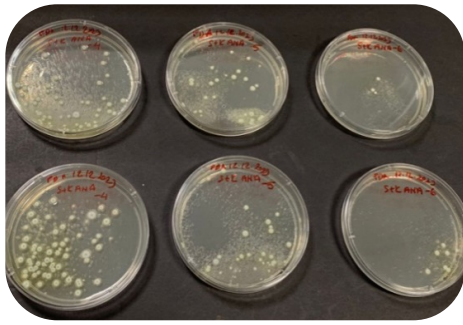
0.gün kontrol sirkeleri hiç beklemeden sirke üretildiği gün analize tabi tutulduklarından dolayı aerob – anaerob farkı bulunmamaktadır. Bu sebeple 0.gün analizleri AE-ANA şeklinde yapılmamıştır. 0.gün sirkelerinin PDA ekiminden 3-5 gün sonra etüven çıkan besiyerlerine bakıldığında Şekil 17(a)'da SK sirkesindeki küf yoğunluğu ile Şekil 17(b)'de SKB sirkesinin küf yoğunluğu aynıdır. Bu sonuçlara dayanarak küf yoğunluğunun azalması için depolama gününün artmasına bağlı olarak *L. mesenteroides* bakterisinin aktivasyonunun artması gerekmekte olduğu görülmüştür. *L. mesenteroides* bakterisi etkisini gösteremediğinden *P. expansum* küfüne etki edememiştir.



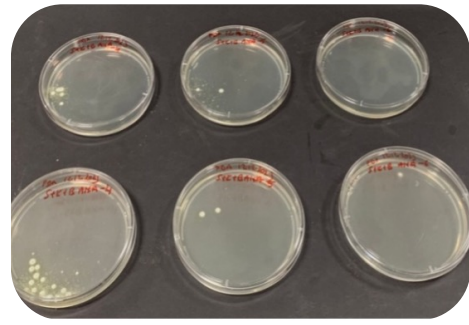
(a)



(b)



(c)

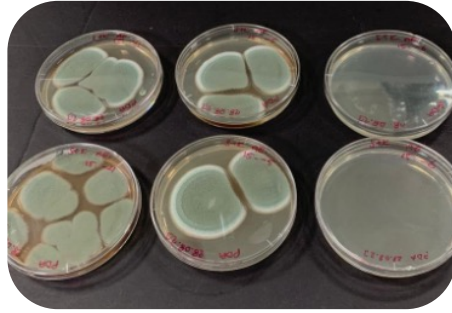


(d)

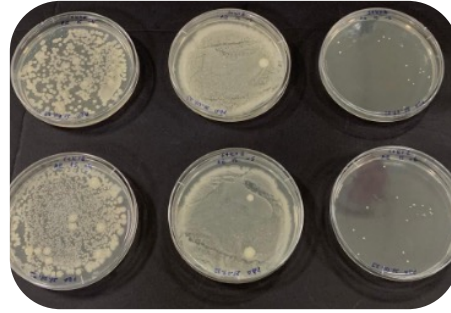
Şekil 18. (a): SK(AE) sirkesinin 7.gün PDA ekim sonucu, (b): SKB(AE) sirkesinin 7.gün PDA ekim sonucu, (c): SK(ANA) sirkesinin 7.gün PDA ekim sonucu, (d): SKB(ANA) sirkesinin 7.gün PDA ekim sonucu.

Sirke örneklerinden 30 günlük fermentasyon süresi boyunca hava ile temas eden gruplarda *P. expansum* gelişmesinin daha yoğun olması bekleniyordu. 0.gün PDA ekim sonucuyla 7.gün PDA ekim sonuçları karşılaştırıldığında SK(AE) sirkesinde küf üremesi devam ederken (Şekil 18a), 7.gün SKB(AE) sirkesinin PDA ekiminde küf yoğunluğunun ciddi derecede azaldığı fakat tamamen inhibe olmadığı görülmüştür (Şekil 18b). Depolama gün sayısı arttıkça laktik asit bakterisinin aktivitesi artarken küf aktivitesinin buna bağlı olarak azaldığı izlenmiştir. SK(ANA) sirkesinin PDA sonuçlarında içerisinde *L. mesenteroides* ilavesi olmamasına rağmen küf üremesinin yerini maya gelişmesinin aldığı görülmüştür (Şekil 18c). Bunun sebebi anaerobik ortamda muhafaza sonucu *P. expansum* küfünün oksijenle temasının kesilmesi ve üremesinin, gelişmesinin durması olarak açıklanabilir. Küf gelişmesi esnasında ortam şartlarının üremeye

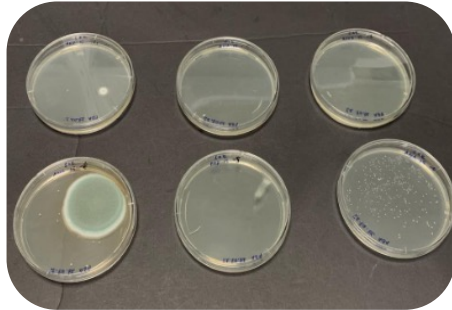
etkisi olduğu görülmüştür. Oksijenin olmadığı ortamda küf gelişmemiştir. SKB(ANA) numunesinin 7.gün PDA sonuçlarında az miktarda maya gelişmesi izlenmiştir (Şekil 18d). Bu durum hem oksijensiz ortam hem de laktik asit bakterisinin ilavesiyle maya-küf gelişmesinin engellenebilir olduğu görülmüştür.



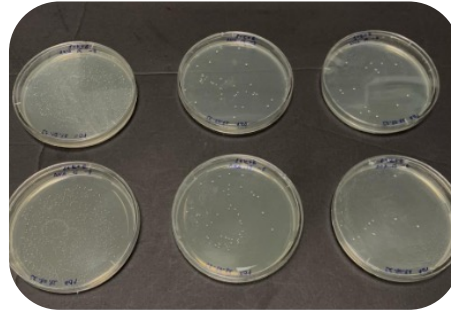
(a)



(b)



(c)

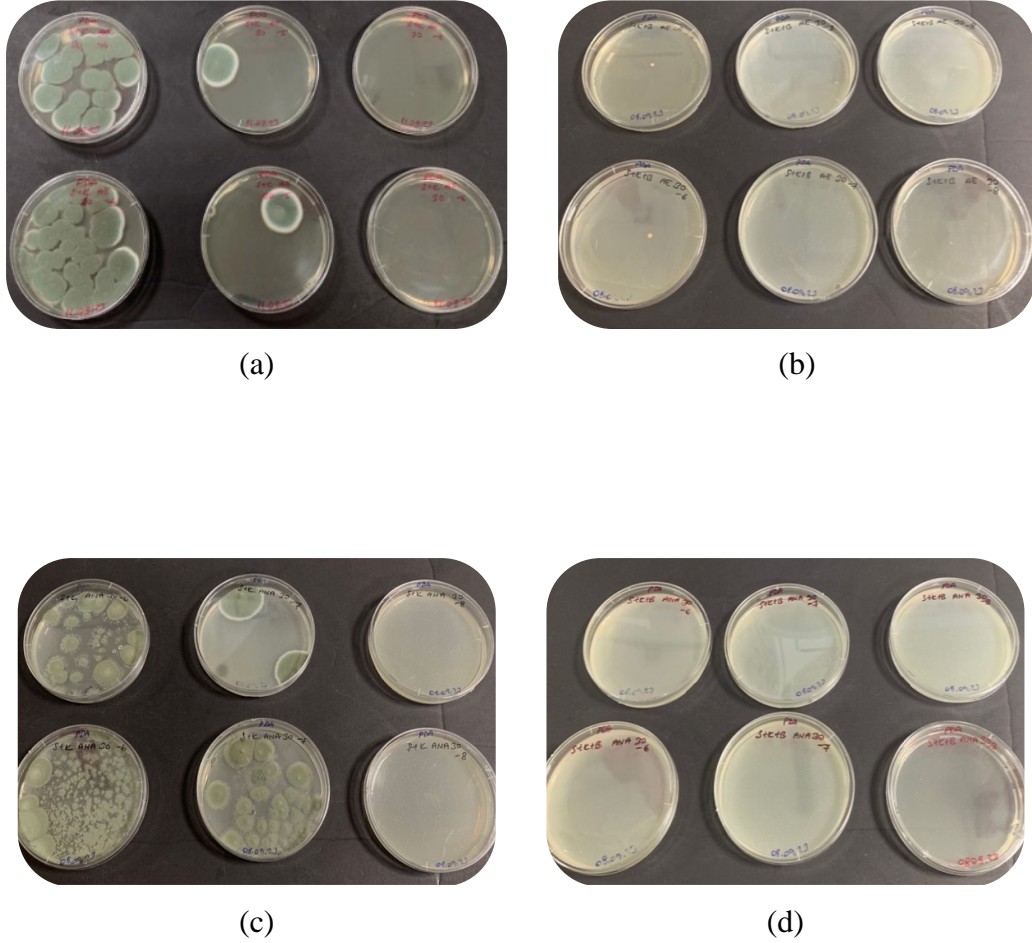


(d)

Şekil 19. (a): SK(AE) sirkesinin 15.gün PDA ekim sonucu, (b): SKB(AE) sirkesinin 15.gün PDA ekim sonucu, (c): SK(ANA) sirkesinin 15.gün PDA ekim sonucu, (d) SKB(ANA) sirkesinin 15.gün PDA ekim sonucu.

15.gün PDA ekim sonuçlarına bakıldığında hava ile temas eden SK(AE) sirkesinde (Şekil 19a) küf yoğunluğu O₂ varlığında devam etmiştir ancak SK(ANA) sirkesinde O₂ teması yaşanmadığından küf yoğunluğu oldukça az gözlenmiş fakat gelişmesi durmamıştır (Şekil 19c). SKB(AE) örneğinde oksijen varlığında laktik asit bakterisinin etkisiyle küf gelişmesi engellenmiştir. SKB(ANA) örneğinde oksijen yokluğu ve laktik asit bakterisi etkisiyle az miktarda maya gelişmesi yaşanmıştır. SKB(AE) numunesinde maya gelişmesi SKB(ANA) sirkesine göre oldukça fazla olmuştur. Bu durum SKB(ANA)

örneğinde oksijen yokluğu ve laktik asit bakterisinin varlığı maya gelişmesini de etkilediğini kanıtlamıştır. 15.gün sirkelerinin laktik asit bakterisi ilaveli sirkelerinde küf gelişmesi izlenmemiştir. Fermentasyon süresi arttıkça ilk başlarda küf yoğunluğunun azalması, gün ilerledikçe küfün inaktive olması beklenen bir gelişmedir.



Şekil 20. (a): SK(AE) 30.gün PDA ekim sonucu, (b): SKB(AE) 30.gün PDA ekim sonucu, (c): SK(ANA) 30.gün PDA ekim sonucu, (d): SKB(ANA) 30.gün PDA ekim sonucu.

Fermentasyon sonlanırken 30. gün sirkelerinde de durum diğer günlerle benzer çıkmıştır. SK(AE) ve SK(ANA) sirkelerinde *P. expansum* gelişmesi devam etmiştir (Şekil 20a-20c). *L. mesenteroides* bakterisi, 30. günlerin SKB(AE) ve SKB(ANA) örneklerinde de etkisini göstermiştir. Laktik asit bakterisinin fermentasyonun son gününe kadar küfün üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Gün sayısı arttıkça küf gelişmesinin azalması ve fermentasyon

sonunda küfün inaktive olması beklenen bir gelişmedir. Bu durumda *L. mesenteroides* bakterisinin antifungal aktivitesi kanıtlanmıştır.

J. Sirke Örneklerinin Toplam Kuru Madde Miktarı

Kurumadde, su başta olmak üzere ve diğer uçucu maddelerin uçurulmasından sonra kalan maddelerin toplamı olarak ifade edilmektedir. Organik asitler, tuz, protein ve mineral maddeleri içermektedir (Yener, 1997). Sirke örneklerinin 30 günlük fermentasyon boyunca ölçülen kuru madde miktarları aşağıdaki Çizelge 16 ve Çizelge 17’de verilmiştir.

Çizelge 16. Aerobik ortamdaki sirke örneklerinin kuru madde değerleri

Örnek Zaman (gün)	K (AE)	SB (AE)	SK (AE)	SKB (AE)
0	1,60±0,45 ^{Aab}	1,60±0,45 ^{Ab}	1,60±0,45 ^{Ab}	1,60±0,45 ^{Aab}
7	1,45±0,66 ^{Aab}	1,42±0,01 ^{Ab}	1,37±0,20 ^{Ab}	0,92±0,01 ^{Ab}
15	0,53±0,06 ^{Cb}	0,93±0,12 ^{Bb}	2,91±0,02 ^{Aa}	1,13±0,12 ^{Bb}
30	2,55±0,04 ^{Ba}	2,89±0,05 ^{Aa}	3,03±0,08 ^{Aa}	2,43±0,06 ^{Ba}

A-C: Aynı satırda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

a-b: Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

Çizelge 17. Anaerobik ortamdaki sirke örneklerinin kuru madde değerleri

Örnek Zaman (gün)	K (ANA)	SB (ANA)	SK (ANA)	SKB (ANA)
0	1,60±0,45 ^{Ab}	1,60±0,45 ^{Ab}	1,60±0,45 ^{Ab}	1,60±0,45 ^{Aa}
7	2,59±0,06 ^{ABa}	1,00±0,02 ^{Cb}	2,32±0,12 ^{Bb}	2,77±0,11 ^{Aa}
15	2,86±0,04 ^{Ba}	3,08±0,01 ^{Ba}	3,67±0,13 ^{Aa}	2,17±0,06 ^{Ca}
30	1,27±0,08 ^{Bb}	2,92±0,15 ^{Aa}	1,97±0,13 ^{ABb}	2,53±0,64 ^{ABa}

A-C: Aynı satırda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

a-b: Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($p<0,05$)

Çalışmamızda kullanılan elma sirkelerinin toplam kuru madde değerleri 0,53-3,66 arasında seyretmiştir. İçerik farklılıkları toplam kuru madde miktarını etkilemektedir. Elma sirkesi üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda (Bayram vd.

(2018), Budak (2010), Tekin (2014)) kurumadde %1.03-7.82 arasında belirlemiştir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada Tangüler ve ark., Budak, Tekin ve Bayram ve ark. sonuçlarıyla uyumludur. Ancak TS 1880’de üzüm sirkesinde kuru madde miktarının şeker hariç minimum 8 g/L olması gerektiği belirtilmiştir.

Akbaş ve ark. (2010) sirkeler üzerine yaptıkları çalışmada kuru madde miktarı 1.95 g/L ile 17.25 g/L arasında belirlenmiştir. Çalıştıkları sirkeler arasında sadece bir sirke 1,95 g/L değerinde çıkmış diğer sirkeler 8,75-17,25 g/L arasında olduğu bildirilmiştir. Ünal ve diğerleri (2007), hızlı yöntem kullanılarak 10.85-11.79 g/L ve yavaş yöntem kullanılarak 12.17-12.60 g/L aralığında tespit etmişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız elma sirkelerinin kuru madde değerleri Akbaş ve ark., Ünal ve ark. bildirdiği değer sınırlarının ve standardın dışında olduğu görülmüştür.

K. Sirke Örneklerinin Alkol Analizi

Alkol analizine tabi tutulan 9 adet sirkenin tamamında etil alkol miktarı hacim olarak %0.5’in altında tespit edilmiştir. Aerobik sirkelerin, (7.Gün SK(AE), 7.Gün SKB(AE), 15.Gün SK(AE), 15.Gün SKB(AE)) kapakları fermentasyon süresi boyunca her gün açılıp cam bagetle karıştırıldığı için alkol oluşumu beklenmiyordu. Anaerobik sirkeler numune gününe kadar kapakları kapalı durduğundan alkol çok düşük olsa da tespit edilmesi öngörülmüştür. Aşağıdaki Çizelge 18’de sirke örneklerinin alkol miktarları verilmiştir.

Çizelge 18. Sirke örneklerinin alkol miktarları

Sirke Kodu	Sonuç %	Ö.B -+	LOQ%0,028
0.Gün Kontrol	Tespit Edilemedi		
7.Gün SK(AE)	Tespit Edilemedi		
7.Gün SKB(AE)	Tespit Edilemedi		
15.Gün SK(AE)	Tespit Edilemedi		
15.Gün SKB(AE)	Tespit Edilemedi		
7.Gün SK(ANA)	0,036	0,0016	
7.Gün SKB(ANA)	0,052	0,0022	
15.Gün SK(ANA)	0,050	0,0022	
15.Gün SKB(ANA)	0,036	0,0016	

Çalışmamızda alkol analizine tabi tutulan 9 sirke numunesinin etil alkol miktarının %0,5’ten düşük olduğu tespit edilmiştir. Alkol miktarı sirkenin kalite

ve verimliliğini ifade eden önemli parametrelerden biridir (Aktan ve Kalkan, 1998). TS 1880 EN 13188 Sirke Standardı'na göre kalıntı alkol oranı şarap sirkeleri dışındaki sirkelerde hacimce %0.5'den fazla olmamalıdır (Anon, 2003).

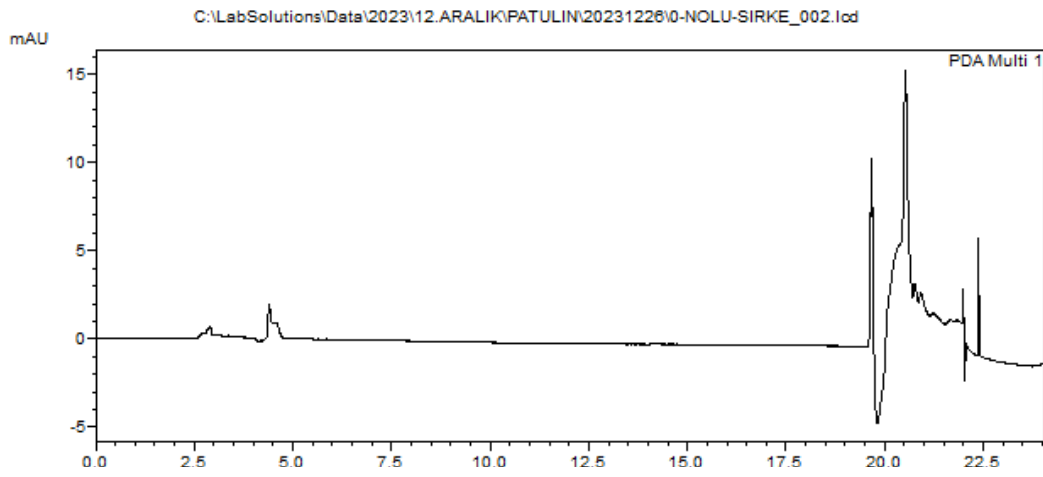
Elijah ve Etukudo muz kabukları kullanarak yaptıkları çalışmada, asetik asit fermantasyonu sonunda %0.0'a alkol miktarının düştüğünü ve şarap sirkesi dışındaki sirkelerde etil alkol miktarının %0.5'ten az olması gerektiğini bildirmişlerdir. Budak, elma sirkesinde alkol belirlenemediğini ifade etmiştir. Benzer şekilde Tangüler (2021) elma atıkları kullanarak ürettikleri sirkelerde alkol miktarını %0,5'ten az olduğunu bildirmişlerdir. Bayram ve ark. pirinç, üzüm ve elma sirkelerinde, Sengün ise yaptığı çalışmada, incir sirkesinde etil alkol miktarının %0,5'ten düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu değerlere göre çalışmamızda elde ettiğimiz sirkelerde alkol değerleri, alkol miktarı bakımından sirke standardına (TS 1880 EN 13188) ve literatüre uygun bulunmuştur (Anon, 2003).

L. Sirke Örneklerinin Patulin Analiz Sonuçları

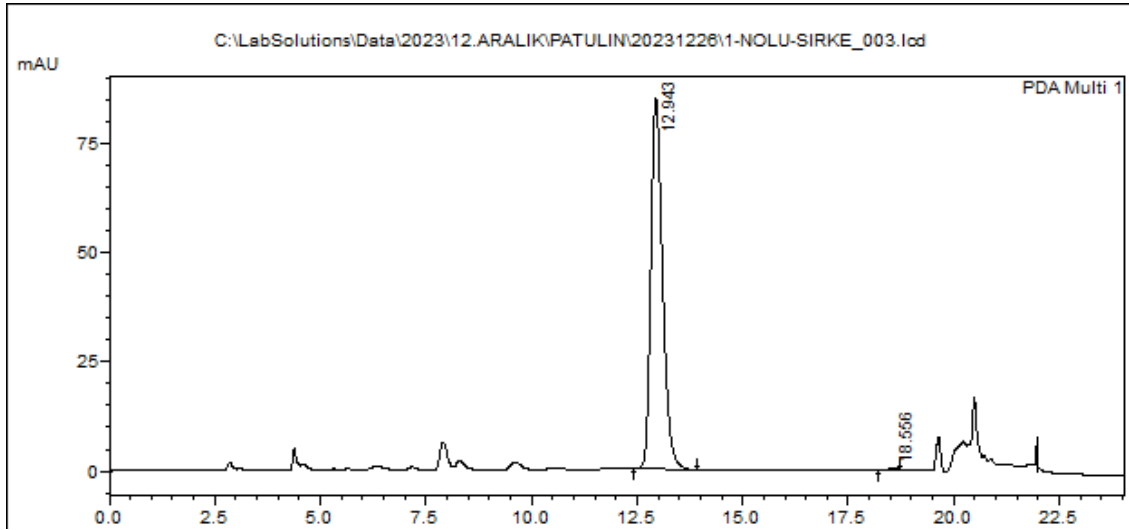
Elma sirkesi örneklerinde patulin analizi HPLC kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Patulin analizine tabi tutulan sirkelerin LOQ (tayin limiti) değerleri, ham sonuçları, geri kazanım sonuçları ve ÖB (ölçüm belirsizliği) değerleri Çizelge 19'da verilmiştir. Patulin analizinde Limit of Quantification (LOQ) değeri 6,01 µg/L olarak belirlenmiştir. Enjeksiyon hacmi 100 µg/L'dir. Çalışmamızda dışarıdan *P.expansum* küfü ilave edilen sirkelerde patuline rastlanması bekleniyordu. İncelenen 9 adet elma sirkesi örneğinin 2 tanesinde patulin tespit edilmiştir. Bu numuneler SK(AE) 7.gün ve SK(AE) 15.gün sirkeleridir. Depolama günü arttıkça patulin seviyesinde artış beklenmektedir.

Çizelge 19. Sirke örneklerinin patulin ham sonuçları (µg/L)

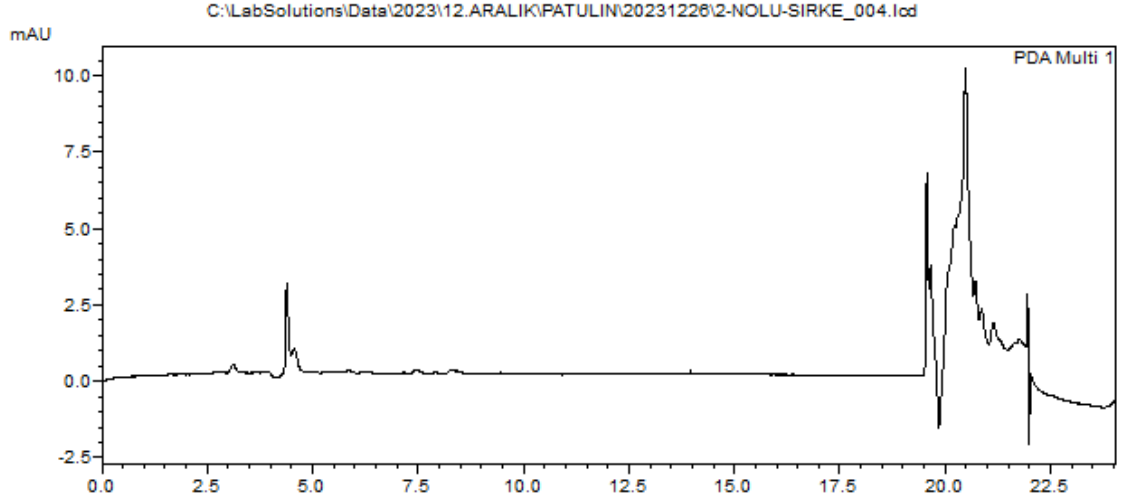
Sirke Kodu	LOQ	Ham Sonuç	Geri Kazanım Sonucu	ÖB
0. Gün Kontrol	6,01	Tespit Edilemedi		
7. Gün SK(AE)	6,01	2567,55	3473,89	764,26
7. Gün SKB(AE)	6,01	Tespit Edilemedi		
15. Gün SK(AE)	6,01	4493,13	6079,29	1337,46
15. Gün SKB(AE)	6,01	Tespit Edilemedi		
7. Gün SK(ANA)	6,01	Tespit Edilemedi		
7. Gün SKB(ANA)	6,01	Tespit Edilemedi		
15. Gün SK(ANA)	6,01	Tespit Edilemedi		
15. Gün SKB(ANA)	6,01	Tespit Edilemedi		



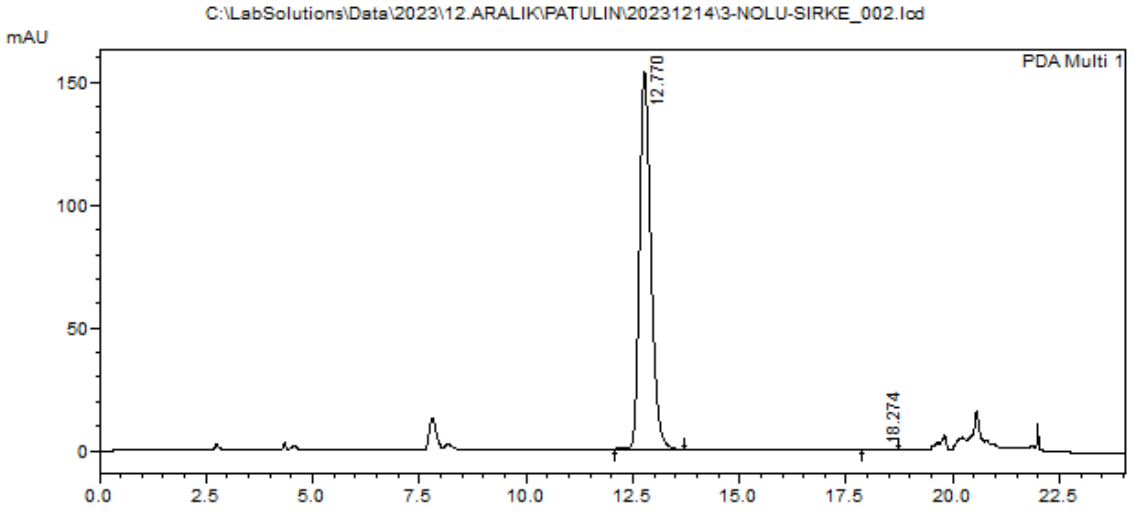
Şekil 21. Patulin tespit edilmemiş 0.gün Kontrol sirkesine ait kromatogram



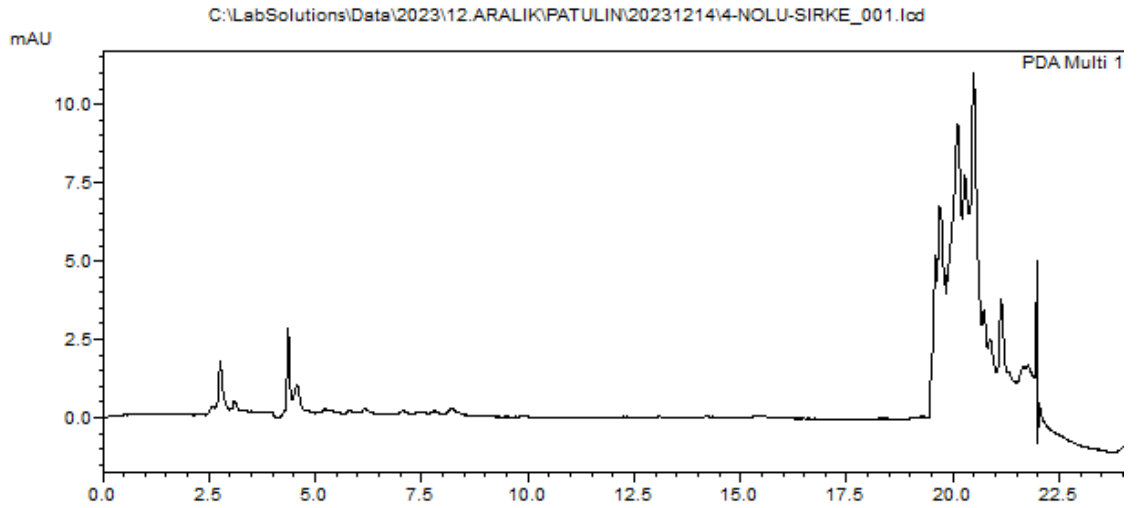
Şekil 22. Patulin tespit edilmiş olan SK(AE) 7.gün sirke örneğine ait kromatogram



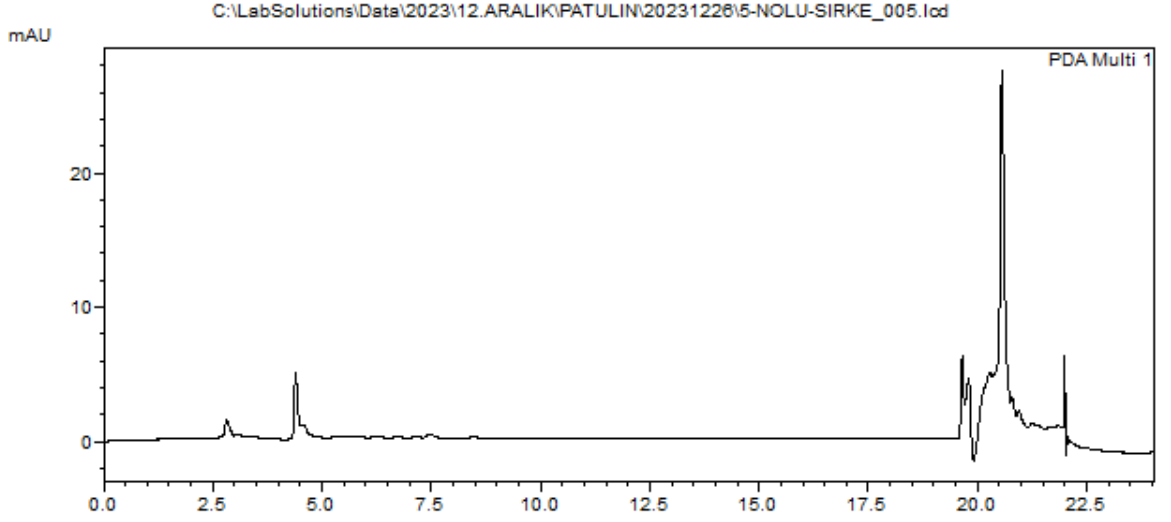
Şekil 23. Patulin tespit edilememiş SKB(AE) 7.gün sirke örneğine ait kromatogram



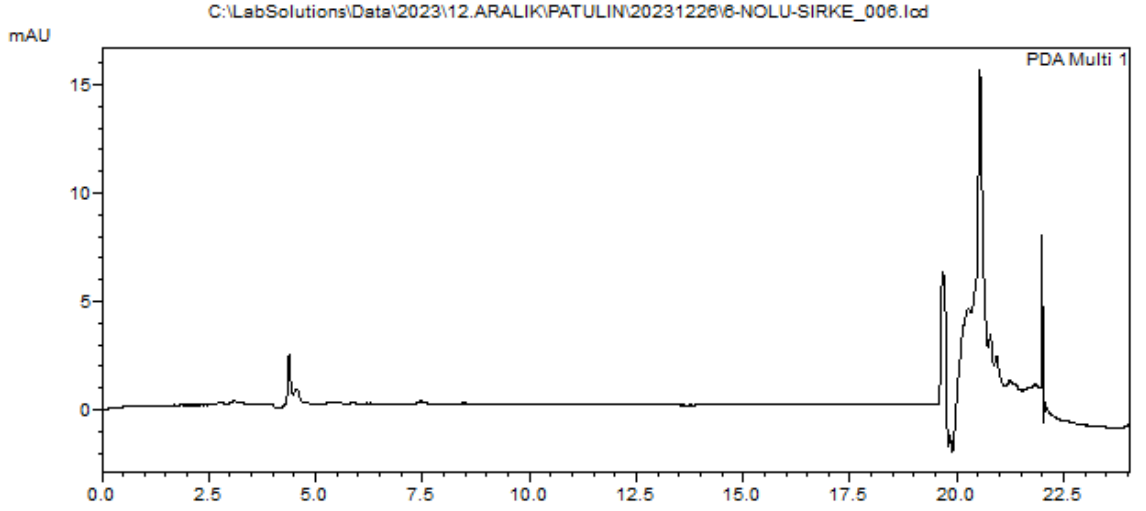
Şekil 24. Patulin tespit edilmiş SK(AE) 15.gün sirkesine ait kromatogram



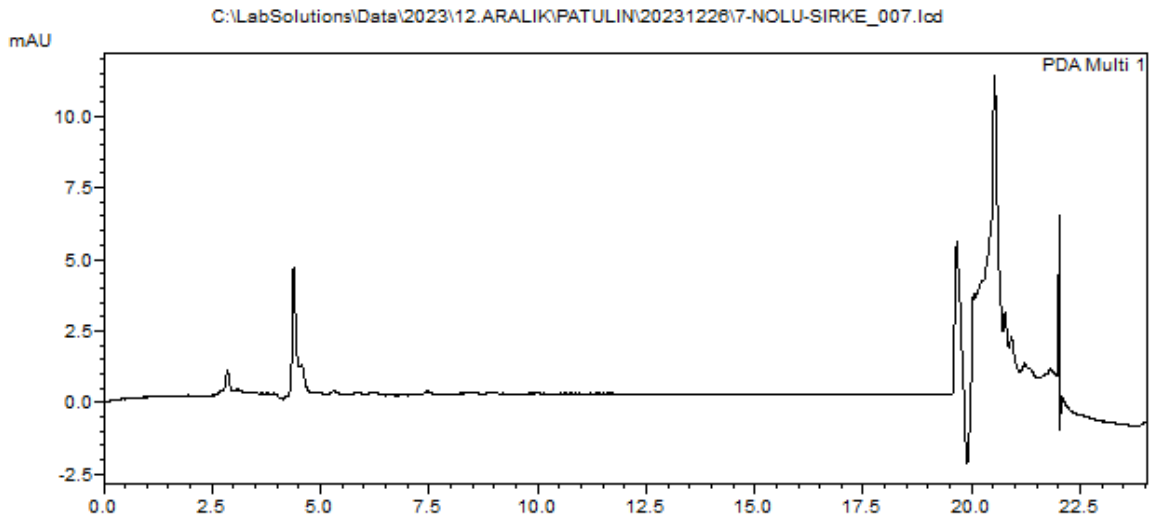
Şekil 25. Patulin tespit edilememiş SKB(AE) 15.gün sirkesine ait kromatogram



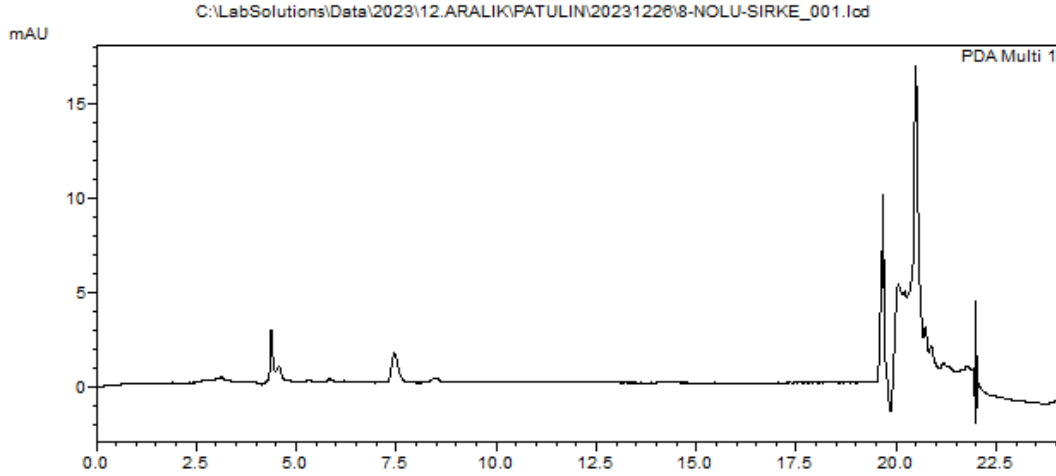
Şekil 26. Patulin tespit edilememiş SK(ANA) 7.gün sirkesine ait kromatogram



Şekil 27. Patulin tespit edilememiş SKB(ANA) 7.gün sirkesine ait kromatogram



Şekil 28. Patulin tespit edilememiş SK(ANA) 15.gün sirkesine ait kromatogram



Şekil 29. Patulin tespit edilememiş SKB(ANA) 15.gün sirkesine ait kromatogram

Yapılan analiz sonucunda 0.gün sirkesinde patuline rastlanmamıştır. Analiz sonuçlarında patulin tespit edilen sirkelerde çıkan ham değerler sırası ile 7.gün SK(AE) ve 15.gün SK(AE) için 2567,55 µg/L ve 4493,13 µg/L, geri kazanım sonuçları ise 3473,89 µg/L ve 6079,29 µg/L olarak bulunmuştur. İçerisine *P.expansum* küfü aşıl原因anan sirkelerin patulin seviyesi gün sayısı artıka yükselmiştir. Kromatogram sonuçlarında dışarıdan *L. mesenteroides* aşıl原因anan SKB(AE) ve SKB(ANA) örneklerinde patulin piki tespit edilmemiştir. Bu *L. mesenteroides* bakterisinin antifungal etkisini doğrulamaktadır. Ayrıca aerobik ortamda muhafaza edilen sirkelerin SK(AE) numunelerinde patulin bulunurken anaerobik sirke numunelerinin hiçbirinde patuline rastlanmamıştır. SK(ANA) sirkesinin 7. ve 15. gün sonuçlarında patulin tespit edilememesi oksijensiz ortamda *P. expansum* küfünün patulin mikotoksinini üretememesini doğrulamaktadır.

SKB(ANA) sirkelerinde *L. mesenteroides* etkinliğinin açıklaması bu durumdan dolayı sağlanamamıştır. *P. expansum* küfünün oksijensiz ortamda sporları çoğalamamış ve mikotoksin üretimi sağlanamamıştır. Guillaume vd. (2021), yaptıkları çalışmada elma yüzeyinden *L. mesenteroides* bakterisini izole edip *Penicillium expansum* küfü üzerindeki antifungal etkisini kanıtlamışlardır. Ticari meyve suyunun patulin miktarı 7,2 µg/mL bildirilmiş. *L. mesenteroides* bakterisi eklenen elma ve üzüm suyunda sırasıyla %42 ve %90 patulin degradasyonunun sağlandığı ve önemli ölçüde ($P < 0.05$) ortadan kaldırıldığı kaydedilmiş. Yaptığımız çalışmadaki değerler ve sonuçlar Guillaume vd. yaptıkları çalışma ile uygunluk göstermiştir.

IV.SONUÇ

Çalışmamızda, *Penicillium expansum* küfünün ve bu küfün ürettiği mikotoksin olan patulinin detoksifikasyonunda laktik asit bakterisinin antifungal etkisini kullanıp, aynı zamanda bu ilave ile sirkenin normal bir elma sirkesinden farkını görmek üzere gerekli analizler yapılmıştır. Bu analiz sonuçları mikrobiyolojik, kimyasal ve en son istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları *L. mesenteroides* bakterisinin potansiyelini ve antifungal etkisini göstermiştir.

Bu çalışmada 17 kavanoz elma sirkesi ile çalışılmıştır. Yapılan analizlerden yola çıkarak *L. mesenteroides* bakterisinin *P. expansum* küfü üzerinde antifungal etkiye sahip olduğu ve patulin detoksifikasyonunda biyolojik detoksifikasyon yöntemiyle inhibe edilebileceği görülmüştür. Çalışmada elma sirkelerinin patulin analizi HPLC metoduyla analiz edilerek yapılmıştır. Patulin tespiti için incelemeye tabi tutulan 9 elma sirkesinde SK (AE) örneğinde beklediğimiz gibi PAT tespit edilmiştir. PAT tespitinde ham değerler sırası ile 7.gün SK(AE) ve 15.gün SK(AE) için 2567,55 µg/L ve 4493,13 µg/L, geri kazanım sonuçları ise 3473,89 µg/L ve 6079,29 µg/L olarak bulunmuştur. Fermentason süresi arttıkça *P.expansum* küfü gelişmesiyle PAT yoğunluğu artmıştır. SKB(AE) sirkesinde laktik asit bakterisinin antifungal etkisinden dolayı PAT tespit edilmemiştir. Oksijensiz ortamda bulunan anaerobik sirkelerde PAT varlığına rastlanmaması, küfün oksijen ile temasında gelişip mikotoksin üretme yeteneğini kazandığı, oksijensiz ortamda ise yeterince gelişemeyip mikotoksin üretememesi durumuyla açıklanabilir. *P. expansum* küfünün PAT üretebilmesi için ortamın aerobik bir ortam olması gerekmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar üzerine, oksijensiz ortamda muhafaza edilen sirkelerde PAT kontaminasyonuna rastlanmaması küfün mikotoksin üretme yeteneğinin oksijene bağlı olduğu ve bundan dolayı ağzı kapalı muhafaza edilen sirkelerin daha güvenilir olduğu söylenebilir. *L.mesenteroides* bakterisinin *P.expansum* ve PAT üzerinde etkili olduğu görülmüştür ve buna bağlı olarak

PAT kontaminasyonunun azaltılmasında laktik asit bakterilerinin antifungal etkilerinin geliştirilmesi gibi stratejilerin geliştirilmesi gıda güvenliğinin sağlanmasında önemli bir aşama olacaktır.

V.KAYNAKÇA

KİTAPLAR

AKTAN N, KALKAN H. (1998). **Sirke Teknolojisi II**. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 82s.

AKTAN, N., KALKAN, H., 1998. **Sirke Teknolojisi**. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 82s.

ARTIK, N. (2007). **Gıda Mikotoksinleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi**, T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı, Gıda Serisi No: 6, Ankara, s9- 57.

DENİZEL, T., 1976, **Maddelerde Görülen Çeşitli Mikotoksinler**. Bursa Gıda Kontrol E. Ve Araştırma Enstitüsü Yayını No:8 Ayyıldız Mat. Ankara sayı 137,147pp.

GIUDİCİ, P., DE VERO, L., GULLO, M. (2017). **Vinegars**. Chapter 10. In Acetic Acid Bacteria: Fundamentals and Food Applications (Ed. Sengun, I.Y.). CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 261-287p.

HEPERKAN D, 2003: **Gıdalarda Mikotoksinler ve Ülkemiz Açısından Önemi**. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu. İstanbul.

JONES JM, (1993), **Food Safety**, Chapter 7, page 141-154, Eagan Press, Minnesota.

LAWLEY, R., CURTİS, L., DAVİS, J. (2008), **Patulin, The Food Safety Hazard Guidebook**. Royal Society of Chemistry Publishing, p. 213-216.

N. AKTAN, VE H. K. YILDIRIM (eds.), **Sirke Teknolojisi**, Sidas Medya, Yayın No: 11-1B, İzmir, 2011.

- ÖZKAYA, H., ŞAHİN, E., TÜRKER, İ., 1991. **Gıda Bilimi ve Teknolojisi**, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Kitabı, Ankara, 345: 443-467.
- PRESCOTT, S.C., DUNN, C.G., (1959). **Industrial Microbiology**. Mcgraw-Hill Book Company, Inc., United States Of America, Pp:945.
- R.W. COPPOCK, R.G. CHRISTIAN, B.J. JACOBSEN, IN: GUPTA, R.C. (Ed.), (2018). **Aflatoxins in Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles**, Academic Press, Cambridge, United States, pp. 983-994.
- STEYN PS, STANDER MA. (1999). **Mycotoxins with Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisin**. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen TLM, eds. General and Applied Toxicology. 2nd Edition. United Kingdom: Macmillan Reference Ltd.; 2145-76.
- TANGÜLER H., ERTEN H., 2006. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü, Türkiye 9.Gıda Kongresi; Bolu.
- TUNAIL N, (2000): Mikrobiyel **Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar**. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara: Sim Matbaacılık Ltd. Şti.
- TÜRKER. (1963). **Sirke Teknolojisi ve Teknikte Laktik Asit Fermantasyonları**. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Kitabı. No: 209, Ankara Üniversitesi Basımevi, 181s.
- ÜNLÜTÜRK, A., TURANTAŞ. F., (2003). **Gıda mikrobiyolojisi**, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, 430s.

MAKALELER

- ABDEL-WAHHAB MA, HASAN AM, ALY SE, MAHROUS KF, (2005): Adsorption of sterigmatocystin by montmorillonite and inhibition of its genotoxicity in the Nile Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). **Mutation Research**, 582, 20-27.

- ACHAERANDÍO, I., GÜELL, C., MEDİNA, F., LAMUELA-RAVENTOS, R., & LÓPEZ, F. (2002). Note. vinegar decolourization by re-activated carbon. *Food science and technology international*, 8(4), 239-242.
- AKBAŞ, M., CABAROĞLU, T. (2010). Ülkemizde üretilen bazı üzüm sirkelerinin bileşimleri ve gıda mevzuatına uygunlukları üzerine bir araştırma. *Gıda*, 35(3), 1-6.
- ALONSO, A.M., CASTRO, R., RODRIGUEZ, M.C., GUILLEN, D.A., BARROSO, C.G. (2004). Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Research International*, 37, 715–721.
- ALSHANNAQ, A., & YU, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International journal of environmental research and public health*, 14(6), 632.
- AOAC 984. 14-1988, Ethanol in Beer. Gas chromatographic method.
- ARTIK, N., GÖKMEN, V., POYRAZOĞLU, E., KAHRAMAN, N. (2001), Elma suyu üretiminde farklı durultma tekniklerinin ürünlerdeki patulin ve bazı kalite kriterlerine etkisi, TOGTAG-TARP PROJE No: 2049.
- AŞKAR M, ASLIM B, BEYATLI Y. 1999. Et ürünlerinden izole edilen *Pediococcus acidilactici* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. *Tr J of Veterinary and Animal Sciences*. 23 (3) 467-474.
- AVANTAGGIATO, G., HAVENAAR, R., VISCONTIA, A. (2004): Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology*; 42: 817-824.
- AVCI, H., ÖZTÜRK, Ş., & ASLIM, B. (2021). Farklı Adli Biyolojik Örnekler Üzerinde Gelişen Mantar Türleri ile İlgili Bazı Doğal Ekstraktların Antifungal Etkileri: Deneysel Çalışmalar. *Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine & Forensic Sciences*, 18(3).

- AYED-BOUSSEMA, I., PASCUSÍ, J. M., RJÍBA, K., MAUREL, P., BACHA, H., & HASSEN, W. (2012). The mycotoxin, patulin, increases the expression of PXR and AhR and their target cytochrome P450s in primary cultured human hepatocytes. *Drug and chemical toxicology*, 35(3), 241-250.
- AYOB, O., HUSSAİN, P. R., NAQASH, F., RÍYAZ, L., KAUSAR, T., JOSHÍ, S., & AZAD, Z. R. A. A. (2022). Aflatoxins: Occurrence in red chilli and control by gamma irradiation. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(4), 2149-2158.
- BAERT, K., MEULENAER, B., D., KASASE, C., HUYGHEBAERT, A., OOGHE, W., DEVLİEGHERE, F. (2007), Free and bound patulin in cloudy apple juice, *Food Chemistry*, 100: 1278–1282.
- BARAD, S., SÍONOV, E., PRUSKY, D. (2016). Role of patulin in postharvest diseases. *Fungal biology reviews*, cilt 30, sayı 1, ss. 24-32.
- BARREİRA, M. J., ALVÍTO, P. C., ALMEİDA, C., M., M. (2010), Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal, *Food Chemistry* 121: 653–658.
- BAYRAM, M., CEMAL, K. A. Y. A., YÜCEL, E. E., BÜŞRA, E. R., GÜLMEZ, E., & TERZİOĞLU, E. (2018). Piriñ sirkesi ve çeşitli ticari sirkelerin bazı kalite özellikleri. *Akademik Gıda*, 16(3), 293-300.
- BHUNÍA, A.K. (2018). Molds and Mycotoxins. In: Foodborne Microbial Pathogens, *Springer*, New York, NY, pp. 167-174.
- BONERBA, E., CECÍ, E., CONTE, R., TANTİLLO, G. (2010), Survey of the presence of patulin in fruit juices, *Food Additives and Contaminants: Part B*, 3(2): 114–119.
- BRAND-WİLLİAMS, W., CUVELİER, M. E., & BERSSET, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- BUDAK NH, (2015). Antioxidant Activity and Phenolic Contents Pomegranate Vinegar. *Agro FOOD Industry Hi Tech* (in press).

- BUDAK, H.N., 2015. Dut Sirkesi Oluşum Sürecinde İleri Analitik Tekniklerle Toplam Antioksidan Aktivitesi ve Fenolik Bileşenleri. *Meyvecilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü* 2 (2), 27-31.
- BUDAK, N. H., KUMBUL DOGUC, D., SAVAS, C. M., SEYDİM, A. C., KOK TAS, T., CİRİS, M. I., & GUZEL-SEYDİM, Z. B. (2011). Effects of apple cider vinegars produced with different techniques on blood lipids in high-cholesterol-fed rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6638-6644.
- BUDAK, N.H., AYKİN, E., SEYDİM, A.C., GREENE, A.K. AND GUZEL-SEYDİM, Z.B. (2014). Functional properties of vinegar. *Journal of food science*, 79: 757-764.
- CASALE, M., ABAJO, M. J. S., SÁIZ, J. M. G., PÍZARRO, C., & FORİNA, M. (2006). Study of the aging and oxidation processes of vinegar samples from different origins during storage by near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 557(1-2), 360-366.
- COTON, M., BREGİER, T., POİRİER, E., DEBAETS, S., ARNİCH, N., COTON, E., DANTİGNY, P. (2019). Production and migration of patulin in *Penicillium expansum* molded apples during cold and ambient storage. *International Journal of Food Microbiology*, cilt 313, 108377.
- DELAGE, N., D'HARLINGUE, A., CECCALDİ, C. B., BOMPEİX, G. (2003). Occurance of Mycotoxins in Fruit Juices and Wine. *Food Control*, 14, 225- 227.
- DİAO, E., WANG, J., Lİ, X., WANG, X., SONG, H., & GAO, D. (2019). Effects of ozone processing on patulin, phenolic compounds and organic acids in apple juice. *Journal of food science and technology*, 56, 957-965.
- DÍAZ, D.E., HAGLER, W.M., BLACKVELDER, J.T., EVE, J.A., HOPKINS, B.A., ANDERSON, K.L., JONES, F.T., WHITLOW, L.W. (2004): Aflatoxin binders 11: reduction of anatoxin MI in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*; 157: 233-241.

- DOLS, M., CHRAÏBÌ, W., REMAUD-SÌMEON, M., LÌNDLEY, N. D., & MONSAN, P. F. (1997). Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2159-2165.
- DOMBRÌNK-KURTZMAN, M. A., & BLACKBURN, J. A. (2005). Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), 241-248.
- DOMBRÌNK-KURTZMAN, M., A. (2006), The isoeopoxydon dehydrogenase gene of the patulin metabolic pathway differs for *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium expansum*, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 89: 1–8.
- DRUSH, S., RAGAB, W., (2003). Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *Journal of Food Protection* 66, 1514–1527.
- DWARAKANATH, C. T., RAYNER, E. T., MANN, G. E., & DOLLEAR, F. G. (1968). Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(2), 93-95.
- ELIJAH, and M. P. Etukudo, Quality evaluation of vinegar produced from banana peel using *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti* isolated from palm wine dreg. *Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment*, 12(4), 205-211, 2016.
- ERRAMPALLÌ, D. (2014). *Penicillium expansum* (blue mold). In *Postharvest decay* (pp. 189-231). Academic Press.
- FRÉMY, J. M., CASTEGNARO, M. J., GLEÏZES, E., DE MEO, M., & LAGET, M. (1995). Procedures for destruction of patulin in laboratory wastes. *Food Additives & Contaminants*, 12(3), 331-336.
- FUCHS, S., SONTAG, G., STIDL, R., EHRLÌCH, V., KUNDÌ, M., KNASMÜLLER, S. (2008), Detoxification of patulin and ochratoxin

- A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria, *Food and Chemical Toxicology* 46: 1398– 1407.
- GAJBHIYE, M. H., & KAPADNİS, B. P. (2016). Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants. *Biocontrol science and technology*, 26(11), 1451-1470.
- GARCÍA-CELA, E., RAMOS, A. J., SANCHÍS, V., & MARÍN, S. (2012). Emerging risk management metrics in food safety: FSO, PO. How do they apply to the mycotoxin hazard? *Food Control*, 25, 797–808.
- GAVAHİAN, M., & CULLEN, P. J. (2020). Cold plasma as an emerging technique for mycotoxin-free food: Efficacy, mechanisms, and trends. *Food Reviews International*, 36(2), 193-214.
- GERBÌ, V., ZEPPA, G., BELTRAMO, R., CARNACINI, A., ANTONELL, A. (1998). Characterization of white vinegars of different sources with artificial neural networks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78, 415-425.
- GEREZ, C. L., TORİNO, M. I., ROLLÁN, G., & DE VALDEZ, G. F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food control*, 20(2), 144-148.
- GHANBARİ, M., JAMİ, M., DOMİG, K. J., & KNEİFEL, W. (2013). Seafood biopreservation by lactic acid bacteria—a review. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 315-324.
- GIANCARLO, B., ELİSABETTA, B., EDMONDO, C., VALERİANA, C., & GIUSEPPİNA, T. (2011). Determination of ochratoxin A in eggs and target tissues of experimentally drugged hens using HPLC–FLD. *Food chemistry*, 126(3), 1278-1282.
- GOMES RJ., BORGES FM., ROSA MF., CASTRO-GÓMEZ RJH., VE SPİNOSA WA. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56 (2): 139–151.

- GÜLEY Z, UYSAL H, KILIÇ S (2004): Laktik asit bakterilerinin aflatoksin oluşturan küfler, aflatoksin üretimi ve aflatoksinler üzerine etkileri. *Akademik Gıda*, 2 (9), 41-45.
- HALLAÇ TÜRK, F., ARAS, Ö., BABALIK, Z., & GÖKTÜRK BAYDAR, N. (2009). Kırmızı üzüm suyu ile sirkenin fenolik bileşik içerikleri ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. *Türkiye*, 7, 247-253.
- Haque MA, Wang Y, Shen Z, Li X, Saleemi MK, He C (2020): Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: a review. *Microbial Pathog*, 142:104095.
- HAWAR, S., VEVERS, W., KARİEB, S., ALİ, B. K., BİLLİNGTON, R., & BEAL, J. (2013). Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 34(2), 502–508.
- HOLZAPFEL, W. H., GEİSEN, R., & SCHİLLİNGER, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International journal of food microbiology*, 24(3), 343-362.
- HORVATH, E., PAPP, G., BELAGYİ, J., GAZDAG, Z., VAGVÖLGYİ, C., PESTİ, M. (2010), In vivo direct patulin-induced fluidization of the plasma membrane of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Food and Chemical Toxicology* 48:1898–1904.
- IARC (1987) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluation of carcinogenicity. An updating of IARC monographs volumes 1 to Supplement 7. IARC, Lyon.
- IOİ, J. D., ZHOU, T., TSAO, R., & F. MARCONE, M. (2017). Mitigation of patulin in fresh and processed foods and beverages. *Toxins*, 9(5), 157.
- JACKSON, L. S., & AL-TAHER, F. (2008). Factors affecting mycotoxin production in fruits. In *Mycotoxins in fruits and vegetables* (pp. 75-104). Academic Press.
- JİMENEZ, M., SANCHÍS, V., MATEO, R., & HERNANDEZ, E. (1988). Detection and quantification of patulin and griseofulvin by high

pressure liquid chromatography in different strains of *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Mycotoxin Research*, 4(2), 59–66.

KABAK, B., VAR, I. 2006. Mikotoksinlerin uzaklaştırılmasında probiyotik laktik asit bakterilerinin kullanımı. Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs, Bolu. 417-420.

KADAKAL Ç., NAS S. (2000), Elma ve Elma Ürünlerinde Patulini Etkileyen Faktörler, *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 87-96.

KADAKAL, C., & NAS, S. (2003b). Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(9), 987-990.

KARACA, H. VE VELİOĞLU, Y., S. (2009), Effects of some metals on chelating agents on patulin degradation by ozone, *Ozone: Science & Engineering*, 31: 224–231.

KARACA, H., VELİOĞLU, Y., S., NAS, S. (2010), Mycotoxins: contamination of dried fruits and degradation by ozone, *Toxin Reviews*; 29(2): 51–59.

KARLOVSKY, P. (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural toxins*, 7(1), 1-23.

KEPİŃSKA-PACELİK, J., & BİEL, W. (2021). Alimentary risk of mycotoxins for humans and animals. *Toxins*, 13(11), 822.

KESER, O., & KUTAY, H. (2009). MİKOTOKSİNLERİN ÖNLENMESİNDE KULLANILAN BAZI YÖNTEMLER II. KİMYASAL VE BİYOLOJİK YÖNTEMLER. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 35(1), 19-29.

KIRCI, H., 2017. Güvem (*Prunus Spinosa*) Meyvesinden Fonksiyonel Sirke Üretimi Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tekirdağ, S57.

KİM, S.H., CHO, H.K., SHİN, H.S. (2012). Physicochemical properties and antioxidant activities of commercial vinegar drinks in Korea. *Food Science and Biotechnology*, 21(6), 1729- 1734.

- KONUŞ, M., YILMAZ, C., & ÇETİN, D. (2020). Yaygın Ve Yaygın Olmayan Sirke Çeşitlerinin Antioksidan Kapasite Düzeylerinin Değerlendirmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9(1), 60-67.
- LAMAISON, J. L. C., & CARNET, A. (1990). Contents in main flavonoid compounds of *Crataegus monogyna* Jacq. and *Crataegus laevigata* (Poiret) DC flowers at different development stages. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 65(1), 315-320.
- Larous, L., Hendel, N., Abood, J. K., & Ghoul, M. (2007). The growth and production of patulin mycotoxin by *Penicillium expansum* on apple fruits and its control by the use of propionic acid and sodium benzoate. *Arab Journal of Plant Protection*, 25, 123-128.
- LECELLIER, A., MOUNIER, J., GAYDOU, V., CASTREC, L., BARBIER, G., ABLAIN, W., MANFAIT M., TOUBAS, D., SOCKALINGUM, G.D. (2014). Differentiation and identification of filamentous fungi by highthroughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *Int J Food Microbiol* 168: 32-41.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation—A review. *Microorganisms*, 5(3), 37.
- Lİ, X.; TANG, H.; YANG, C.; MENG, X.; LIU, B. (2019). Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Control*, 96, 47–52.
- LİMA, N., & SANTOS, C. (2017). MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. *Current Opinion in Food Science*, 13, 26-30.
- LİU, B. H., YU, F. Y., WU, T. S., Lİ, S. Y., SU, M. C., WANG, M. C., & SHİH, S. M. (2003). Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and applied pharmacology*, 191(3), 255-263.

- LOVETT, J., AND PEELER, J. T.,(1973), Effect of pH on the thermaldestruction kinetics of patulin in aqueous solutions. *Journal of Food Science*, 38, 1094±1095.
- MAGNUSSON, J., & SCHNÜRER, J. (2001). Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and environmental microbiology*, 67(1), 1-5.
- MAING, I. Y., AYRES, J. C., & KOEHLER, P. E. (1973). Persistence of aflatoxin during the fermentation of soy sauce. *Applied microbiology*, 25(6), 1015-1017.
- MANNANI, N., TABARANI, A., EL ADLOUNI, C., & ZINEDINE, A. (2021). Aflatoxin M1 in pasteurized and UHT milk marketed in Morocco. *Food Control*, 124, 107893.
- MEERDINK, G.L. (2002). Mycotoxins. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 1, 8993.
- MOAKE, M. M., PADILLA-ZAKOUR, O. I., & WOROBO, R. W. (2005). Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(1), 8–21.
- MOKOENA, M. P., MUTANDA, T., & OLANIRAN, A. O. (2016). Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. *Food & Nutrition Research*, 60(1), 29630.
- MORALES, H., MARÍN, S., ROVIRA, A., RAMOS, A. J., & SANCHÍS, V. (2007). Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. *Letters in applied microbiology*, 44(1), 30-35.
- MORALES, H., MARÍN S., RAMOS, A., J., SANCHÍS, V. (2010), Influence of post- harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A Review, *Food Control*, 21:953–962.

- MORALES, H., MARÍN, S., ROVIRA, A., RAMOS, A. J., SANCHÍS, V. (2006). Patulin Accumulation in Apples by *Penicillium expansum* During Postharvest Stages. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 30-35.
- MORALES, M. L., GONZALEZ, A. G., & TRONCOSO, A. M. (1998). Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars. *Journal of Chromatography A*, 822(1), 45-51.
- MORALES, M. L., TESFAYE, W., GARCÍA-PARRILLA, M. C., CASAS, J. A., & TRONCOSO, A. M. (2001). Sherry wine vinegar: physicochemical changes during the acetification process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(7), 611-619.
- MORALES, M.L., BENITEZ, B., TRONCOSO, A.M., (2004). Accelerated Aging Of Wine Vinegars With Oak Chips: Evaluation Of Wood Flavour Compounds. *Food Chemistry*, 88:305-315.
- MOSS, M. O. (2008). Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1239-1243
- NGEA, G. L. N., YANG, Q., TCHABO, W., CASTORÍA, R., ZHANG, X., & ZHANG, H. (2021). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LB7 isolated from apple surface inhibits *P. expansum* in vitro and reduces patulin in fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 339, 109025.
- NORTHOLT, M.D., VAN EGMOND, H.P., PAULSCH, W.E., (1978). Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, 41, 885–890.
- NURAIIDA, L. (2015). A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*, 4(2), 47-55.
- OMAK, G., ÖZCAN, T., YILMAZ-ERSAN, L., (2016). Biyolojik Detoksifikasyon ve probiyotikler. *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi* (Journal of Agricultural Faculty of Uludag University), Cilt 30, Sayı 1, 157- 168.

- OZTURK, I., CALISKAN, O. Z. N. U. R., TORNUK, F., OZCAN, N., YALCIN, H., BASLAR, M., & SAGDIC, O. (2015). Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 144-151.
- ÖZCAN, E., SELVİ, S. S., NIKEREL, E., TEUSINK, B., TOKSOY ÖNER, E., & ÇAKIR, T. (2019). A genome-scale metabolic network of the aroma bacterium *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 3153-3165.
- ÖZDEMİR, M., & ÖZİLGİN, M. (1997). Comparison of the quality of hazelnuts unshelled with different sizing and cracking systems. *Journal of agricultural engineering research*, 67(3), 219-227.
- ÖZEN, F. B. (2021). Spektroskopik tekniklerin sirke üretiminin izlenmesi ve sirkenin taşımasının tespitinde kullanımı.
- PAWLOWSKA, A.M., ZANNINI, E., COFFEY, A., ARENDT, E.K., (2012). “Green preservatives”: combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7>.
- PERAIĆA, M., RADIĆ, B., LUCIĆ, A., & PAVLOVIĆ, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the world health organization*, 77(9), 754.
- PFEILER, E. A., & KLAENHAMMER, T. R. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in microbiology*, 15(12), 546-553.
- PITT, J.I. AND HOCKING, A.D., (1985), Fungi and Food Spoilage, *Academic Pres*, Sydney, 413 p.
- PRIETA, J., MORENO, M.A., BAYO, J., DÍAZ, S., SUÁREZ, G., DOMÍNGUEZ, L., CANELA, R., SANCHÍS, V., (1993). Determination of patulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with extraction by diphasic dialysis. *Analyst*, 118, 171–173.

- RASPOR, P. AND GORANOVIĆ, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical reviews in biotechnology*, 28: 101-124.
- REDDY, K. R. N., SPADARO, D., GULLINO, M. L., & GARIBALDI, A. (2011). Potential of two Metschnikowia pulcherrima (yeast) strains for in vitro biodegradation of patulin. *Journal of food protection*, 74(1), 154-156.
- REN, Y., YAO, M., CHANG, P., SUN, Y., LI, R., MENG, D., et al. (2021). Isolation and characterization of a Pseudomonas poae JSU-Y1 with patulin degradation ability and biocontrol potential against *Penicillium expansum*. *Toxicon*, 195, 1–6.
- ROSEANU, A., JECU, L., BADEA, M., & EVANS, R. W. (2010). Mycotoxins: An overview on their quantification methods. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47(1), 79-86.
- SADIQ, F. A., YAN, B., TIAN, F., ZHAO, J., ZHANG, H., & CHEN, W. (2019). Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1403-1436.
- SANZANI, S.M., SCHENA, L., DE GIROLAMO, A., IPPOLITO, A., GONZALEZCANDELAS, L. (2010). Characterization of genes associated with induced resistance against *Penicillium expansum* in apple fruit treated with quercetin. *Postharvest Biology and Technology*, cilt 56, sayı 1, ss. 1-11
- SCHILLINGER, U., & VILLARREAL, J. V. (2010). Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food control*, 21(2), 107-111.
- SENGUN, I. Y. (2013). Microbiological and chemical properties of fig vinegar produced in Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 7(20), 2332-2338.
- SENGUN, I.Y. (2013). Microbiological and chemical properties of fig vinegar produced in Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 7(20), 2332-2338.

- SENGUN, I.Y., KİLİC, G., OZTURK, B. (2020). Screening physicochemical, microbiological and bioactive properties of fruit vinegars produced from various raw materials. *Food Science and Biotechnology*, 29(3), 401-408.
- SİEGEL, D. VE BABUSCİO, T. (2011). Mycotoxin management in the European cereal trading sector. *Food Control*, 22, 1145-1153.
- SİLVA, S. J. N. D., SCHUCH, P. Z., BERNARDİ, C. R., VAINSTEİN, M. H., JABLONSKİ, A., & BENDER, R. J. (2007). Patulin in food: state-of-the-art and analytical trends. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29, 406-413.
- SINGLETON, V. L., & ROSSİ, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- ŞENGÜN, İ. Y., KILIÇ, G. (2018). Dut sirkesinin mikrobiyolojik, fiziksel, kimyasal, antiradikal ve antimikrobiyal özellikleri. *Akademik Gıda*, 16(2), 168-175. doi:10.24323/akademik-gida.449860.
- TANGNİ, E., K., THEYS, R., MİGNOLET, E., MAUDOUX, M., MİCHELET, J., Y., LARONDELLE, Y. (2003), Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment, *Food Additives and Contaminants* 20(5):482–489.
- TANGÜLER, H., HANDE, M. E. R. T., İLMAN, F., YÜCEL, B., & GENÇTÜRK, S. (2021). Elma atıklarından elma sirkesi üretimi üzerine bir araştırma. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10(1), 132-139.
- TANİWAKİ, M. H., VİTALİ, A. D. A., & EİROA, M. N. U. (1992). Migration of patulin in apples. *Journal of food protection*, 55(11), 902-904.
- TANNOUS, J., KELLER, N. P., ATOUİ, A., EL KHOURY, A., LTEİF, R., OSWALD, I. P., & PUEL, O. (2018). Secondary metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on recent advances in patulin research. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(12), 2082-2098

- TESFAYE, W., MORALES M.L., GARCA-PARRILLA M.C., TRONCOSO A.M., (2002). Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 13 (1), 12-21.
- THOMAS, L. V., & WIMPENNY, J. W. (1996). Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology*, 62(6), 2006-2012.
- TOPÇU, A., BULAT, T., WİSHAH, R., BOYACI, İ., H. (2010), Detoxification of aflatoxin B1 and patulin by *Enterococcus faecium* strains, *International Journal of Food Microbiology* 139:202–205.
- TOSUN, N., & DELEN, N. (1997, June). Minimising of contamination of aflatoxigenic fungi and subsequent aflatoxin development in fig orchards by fungicides. In *I International Symposium on Fig 480* (pp. 193-198).
- TOURNAS, V. H. (2005). Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Critical reviews in microbiology*, 31(1), 33-44.
- TURGUT D.Y., SEYDİM A.C. (2013). Akdeniz Bölgesinde yetiştirilen bazı nar (*Punica granatum L.*) çeşit ve genotiplerinin fenolik bileşenleri ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. *Akademik Gıda*, 11 (2): 51-59.
- VARGA, J., RÍGÓ, K., & TÉREN, J. (2000). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International journal of food microbiology*, 59(1-2), 1-7.
- WEİ, C., YU, L., QÍAO, N., ZHAO, J., ZHANG, H., ZHAİ, Q., et al. (2020). Progress in the distribution, toxicity, control, and detoxification of patulin: A review. *Toxicon*, 184, 83–93
- WELKE, J., E., HOELTZ, M., DOTTORÌ, H., A., NOLL, I., B. (2010), Fungi and patulin in apples and the role of processing on patulin levels in juices: a study on naturally contaminated apples, *Journal of Food Safety*, 30:276–287.

- WRIGHT, S.A.I., DE FELICE, D.V., IANIRI, G., PINEDO-RIVILLA, C., DE CURTIS, F., CASTORIA, R. (2014). Two rapid assays for screening of patulin biodegradation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, cilt 11, ss. 1387-1398.
- XIA T., ZHANG B., DUAN W., ZHANG J. AND WANG M. (2020). Nutrients and bioactive components from vinegar: A fermented and functional food. *Journal of Functional Foods*, 64: 103681.
- YÉPEZ, A., LUZ, C., MECA, G., VIGNOLO, G., MANES, J., & AZNAR, R. (2017). Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin. *Food Control*, 78, 393-400.
- YILMAZ, A.; ÖZAY, G., (2001). Gıda ve Yemlerde Mikotoksinlerin Detoksifikasyonu. *Gıda Dergisi*. Temmuz, 80-84.
- YUE, T., DONG, Q., GUO, C., & WOROBO, R. W. (2011). Reducing patulin contamination in apple juice by using inactive yeast. *Journal of food protection*, 74(1), 149-153.

ELEKTRONİK KAYNAKLAR

- ANON, (2012A), www.tr.wikipedia.org/wiki/Pastörizasyon, (Erişim Tarihi: 07.12.2023)
- Budak, H.N., Güzel-Seydim, Z.B. (2012). Sirke üretimi ve bazı fonksiyonel özellikleri, <http://www.gidateknolojisi.com.tr/haber/2012/10/sirke-uretimi-ve-bazi-fonksiyonelozellikleri>, (Erişim Tarihi: 20.10.2023)

TEZLER

- AYBEK, A., (2019). Geleneksel Yöntemlerle Zivzik Narından Sirke Üretimi ve Elde Edilen Sirkenin Kalite Parametrelerinin Araştırılması, Siirt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 84s, Siirt.
- BAKIR S. (2014). Bazı Sirke Çeşitlerinin Fenolik Madde İçeriği Ve İn Vitro Biyoerişebilirliğinin Ve Üzüm İle Elma Sirkesi Üretimi Sırasında Antioksidan Aktivitede Meydana Gelen Değişimlerin İncelenmesi.

Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

BUDAK HN, (2010). Elma ve Üzümünden Üretilen Sirkelerin Bileşenleri ve Fonksiyonel Özellikleri Üzerine Araştırma. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 190s, Isparta.

KADAŞ, Z., 2011. Alıç Sirkesinin Biyoaktif Özelliklerinin Ve Metabolik Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bolu.

KARACA, H. (2005), Kuru incirlerin aflotoksin, patulin, ergosterol içeriği ve farklı koşullarda aflotoksinlerin parçalanma düzeyleri, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.

ÖZÇELİK, S. (1979) Niğde, Amasya ve Erzincan İllerinde Üretilen Önemli Elma Çeşitlerinde Mikrobiyal Bozulmalar ve Bozulan Elmalarda Patulin Oluşumu, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Erzurum, 81s.

S. TEKİN, Elma ve üzüm sirkelerinin ağır metal içeriklerinin ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2014.

TAN, S.C., 2005. Vinegar Fermentation. a Thesis of Master. University of Louisiana, Department of Food Science, pp:123.

ÜNAL, E., 2007. Dimrit üzümünden değişik yöntemlerle sirke üretimi üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

DiĞER KAYNAKLAR

ANON (1988). TSE Sirke, TS 1880, Türk Standartları Enstitüsü. Necatibey Cad. 112, Ankara.

ANON (2003). TSE - Sirke-Tarım Kökenli Sıvılardan Elde Edilen Ürün-Tarifler, Özellikler ve İşaretleme, TS 1880 EN 13188, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey Cad. 112, Ankara.

ANON (2004). TSE Sirke – Tarım Kökenli Sıvılardan Elde Edilen Ürün TS 1880 EN 13188 - Tadil ICS: 01.040.67;67.220.20, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey Cad. 112, Ankara.

ANON, (1952). Gıda Maddelerinin ve Umumi Sağlığı ilgilendiren Eşya ve Levazımın Hususi Vasıflarını Gösteren Tüzük, Başbakanlık Devlet Matbaası, Ankara.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). (2005). FDA food code CPG sec. 510.150. In Apple Juice, apple juice concentrates and apple juice products–adulteration with patulin; Food and Drug Administration: Silver Spring. Washington DC, USA: FDA (MD, USA).

OIV: International Organisation of Vine and Wine. "Compendium of methods of analysis of wine vinegars (2000): OENO 52-2000 Wine vinegars - determination of total acidity content. <https://www.oiv.int/public/medias/2697/oeno-52-2000.pdf>

ŞİMŞEK O, BİLGİN B. (1996). Gıda sanayinde kullanılan laktik asit bakterilerinin oluşturdukları antibiyotiklerin biyokimyasal ve genetik özellikleri. Standart, 409, 89- 96.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Zeynep ÇETİN

Öğrenim Durumu

Yüksek Lisans: İstanbul Aydın Üniversitesi

Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği

Lisans: İstanbul Aydın Üniversitesi

Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği

Staj Bilgiler : Arma Grup Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş (2019)

Kuzey Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. (2019)

ANKA GRUP DIŞ TİC. GIDA SAN. A.Ş.

Kurs / Sertifika Bilgisi :

Sertifika Adı : Geleneksel Girişimcilik Eğitimi

Alındığı Kurum : KOSGEB

Sertifika Adı : Gıdaya Sektörel Yaklaşım

Alındığı Kurum : TMMOB Gıda Mühendisleri Odası İstanbul Şube

Sertifika Adı : Gıda Mühendisliği 21. Yüzyıl Farkındalık Semineri

Alındığı Kurum : TMMOB Gıda Mühendisleri Odası

Sertifika Adı : Gıda Güvenliği Eğitimi

Alındığı Kurum : Pakmaya / Özyeğin Üniversitesi

Sertifika Adı : İleri Girişimcilik Eğitimi

Alındığı Kurum : KOSGEB