

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cihan ÇELİK

**ADANA'DA BAZI MARKETLERDE SATIŞA SUNULAN ÇEKİRDEKSİZ
KURU ÜZÜMLERDE OKRATOKSİN A VARLIĞININ HPLC YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2008

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ADANA'DA BAZI MARKETLERDE SATIŞA SUNULAN
ÇEKİRDEKSİZ KURU ÜZÜMLERDE OKRATOKSİN A VARLIĞININ
HPLC YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Cihan ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 22 / 01 / 2008 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

İmza..... İmza İmza
Yard. Doç. Dr. Işıl VAR Prof. Dr. Bülend EVLİYA Prof. Dr. Semih TANGOLAR
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: ZF2006YL66

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ADANA'DA BAZI MARKETLERDE SATIŞA SUNULAN
ÇEKİRDEKSİZ KURU ÜZÜMLERDE OKRATOKSİN A VARLIĞININ
HPLC YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Cihan ÇELİK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR
Yıl: 2007, Sayfa: 66
Jüri: Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR
Prof. Dr. Bülend EVLİYA
Prof. Dr. Semih TANGOLAR

Okratoksin A, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler tarafından üretilen önemli mikotoksinlerden olup nefrotoksik ve kanserojenik aktiviteye sahip olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır.

Önemli bir ihracat ürünü olan kuru üzümdeki OTA varlığı, ülkemizin de içinde bulunduğu üzüm yetiştiriciliğinin yaygın olduğu ülkelerde hem ekonomik hem de sağlık ile ilgili sorunları beraberinde getirmiştir. Ürünlerde OTA düzeylerinin pbb konsantrasyonlarında bulunması, arama çalışmalarında hassas yöntemlerle çalışma gereksinimini doğurmaktadır. Bu çalışmada, Adana'da satışa sunulan çekirdeksiz kuru üzümde OTA varlığı hassas bir cihaz olan HPLC kullanılarak araştırılmıştır.

Analize alınan 40 kuru üzüm örneğinden elde edilen bulgulara göre, 26 örnekte 0.38–20.90 µg/kg arasında OTA'ya rastlanırken, bu örneklerin 3'ünde OTA miktarının Türk Gıda Kodeksi'nde bildirilen maksimum limit olan 10 µg/kg değerini aştığı (11.34, 19.39, 20.9 µg/kg) görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kuru üzüm, Okratoksin A, HPLC, Immunoaffinite kolon

ABSTRACT

MSc THESIS

**AN INVESTIGATION OF OCHRATOXIN A IN RAISINS BY HPLC
SOLD IN ADANA RETAIL MARKETS**

Cihan ÇELİK

**DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Işıl VAR

Year: 2007, Page: 66

Jury: Assist. Prof. Dr. Işıl VAR

Prof. Dr. Bülend EVLİYA

Prof. Dr. Semih TANGOLAR

Ochratoxin A is one of the major mycotoxin which is produced by the moulds belonging to several *Aspergillus* and *Penicillium* species and it holds great importance due to its nephrotoxic and cancerogenic affects.

In many countries worldwide (including our country) where grape producing is common, the occurrence of OTA in raisins, which are the main export products, bring the problems relevant to economy and healths. Since the level of OTA in foods is in ppb concentration, it is required to use sensitive methods in surveys. In this study, the quantity of OTA in raisins sold in Adana was studied on using HPLC device which brings out sensitive and reliable results.

According to the analyses results of 40 raisin samples, OTA was found in 26 samples between 0.38–20.90 µg/kg and in 3 samples OTA was (11.34, 19.39, 20.9 µg/kg) above Turkish Legal Limits (10 µg/kg).

Key words: Raisins, Ochratoxin A, HPLC, Immunoaffinity Column

TEŞEKKÜR

Araştırmanın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gsteren sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR'a,

Araştırmanın ön çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Bülent KABAK'a ve çalışmamda emeği geçen Mikrobiyoloji Bölümündeki tüm çalışanlara,

Analizlerin yapılması ve tezi yazma aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ev arkadaşım Orhan GÖZEN'e, abi gibi gördüğüm Ali Ekrem AKÇAY ve sevgili ailesine, sevgili kardeşlerim Ersin ÇELİK ve Furkan ÇELİK'e,

Beni yetiştiren ve yaşamım boyunca bana maddi ve manevi destek veren sevgili annem Ayşe ÇELİK ve babam Celal ÇELİK'e teőekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
RESİMLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Mikotoksinler	7
2.1.1. Mikotoksinler Hakkında Genel Bilgi	7
2.1.2. Mikotoksikozis Ve Neden Olan Küfler.....	10
2.1.3. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	13
2.2. Okratoksin A	14
2.3. Kuru Üzüm.....	22
2.4. Kuru Üzümde OTA Varlığı İle İlgili Yapılan Çalışmalar	27
2.5. Kuru Üzümde OTA Varlığını Belirlemede Kullanılan Yöntemler	30
3. MATERYAL VE METOT	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Kuru Üzüm.....	32
3.1.2. Kimyasal Maddeler	32
3.1.3. Okratoksin A Standardı.....	32
3.1.4. OTA Immunoaffinity Kolonu	33
3.2. Metot	33
3.2.1. OTA Standart Çözeltinin Hazırlanması	33
3.2.2. Kuru Üzümlerde OTA Varlığının Araştırılması	33
3.2.3. OTA Analizi.....	35

3.2.4. Geri Kazanım, Tespit ve Ölçüm Limiti Çalışmaları	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	37
4.1. Geri Kazanım, Tespit ve Ölçüm Limiti Çalışmaları	37
4.2. Kuru Üzümlerde OTA Varlığı	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA NO

Çizelge 2.1. Önemli mikotoksinler, üretici küfleri, sorunlu ürünler ve etkileri.....	12
Çizelge 2.2. Okratoksin üreten küflerin oluşturdukları diğer mikotoksinler...	17
Çizelge 3.1. Kuru üzüm örneklerinin ekstraksiyon aşaması.....	35
Çizelge 4.1. OTA açısından temiz kuru üzümde % geri kazanım çalışması.....	38
Çizelge 4.2. Kuru üzüm örneklerindeki OTA düzeyleri.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA NO

Şekil 2.1. Değişik küflerin gelişmesi ve mikotoksin üretmesi için sıcaklık ve su aktivitesi koşulları.....	16
Şekil 2.2. Okratoksin A moleküler yapısı.....	21
Şekil 2.3. Okratoksin A, Okratoksin B, Okratoksin C, 4-hidroksiokratoksin A ve Okratoksin α 'nın kimyasal yapısı.....	21
Şekil 4.1. Kuru üzüm örneğine ait HPLC kromatogramı.....	38

RESİMLER DİZİNİ**SAYFA NO**

Resim 2.1. Sultani üzüm (a. yaş, b. kuru).....	25
Resim 4.1. OTA analizlerinde kullanılan HPLC cihazı (Agilent 1100).....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

CAS : Kimyasal maddelerin incelendiği servis kayıt numarası
(Chemical Abstracts Service Registry Number)

ppb : Parts per billion

ppm : Parts per million

1. GİRİŞ

Tarımsal ürünlerin ve çeşitli gıda maddelerinin yapısında mikroorganizmalar ya doğal olarak bulunmakta veya dışardan kontamine olmaktadır. Bu mikroorganizmalar içinde küfler, gerek gıda maddelerinin bozulmasına yol açmaları gerekse oluşturdukları metabolitler nedeniyle zehirlenme ve hastalıklara neden olmalarından dolayı büyük önem taşımaktadır (Karadeniz ve Ekşi, 2002). Küflerin ikincil metabolizmaları sonucu sentezlenen toksik maddelere genel olarak “mikotoksin” denilmektedir. Dünyada 100’ün üzerinde küf türü tarafından üretilen yaklaşık 400 kadar ikincil metabolitin toksik aktiviteye sahip olduğu ve dünyada yetiştirilen tarım ürünlerinin dörtte birinin mikotoksin içerdiği bildirilmektedir (Kabak ve Var, 2006).

Bazı mikotoksinler pişirme işlemlerine ve gıda işleme yöntemlerine karşı kararlılıklarını koruyamamalarına karşın, bazı mikotoksinler gıda işleme yöntemlerine karşı direnç göstermekte ve kimyasal kararlılıklarını koruyabilmektedirler (Omaye, 2004).

Önemli mikotoksinlerden biri olarak bilinen okratoksinler, *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsi küfler tarafından üretilmektedir (Ringot ve ark., 2006). Okratoksinlerin 10’u aşkın türevi bilinmektedir. Teknolojik olarak en önemlileri Okratoksin A (OTA), Okratoksin B (OTB) ve Okratoksin C (OTC)’dir (Gümüş ve ark., 2003).

Okratoksin A ve daha az toksik dekloro analogu olan Okratoksin B ilk kez 1965 yılında Güney Afrika’lı kimyacılar tarafından tanımlanmış ve D.B. Scott tarafından sorgum tanelerinden izole edilen *Aspergillus ochraceus* K-804 suşundan izole edilmiştir (Tunail, 2000; Karagözlü ve Karapınar, 2000).

Küflerin OTA üretmesi sıcaklık, su aktivitesi, substrat kompozisyonu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Okratoksin üreten küfün cinsine göre de su aktivitesi ve sıcaklık istemleri değişebilmektedir. Örneğin, *Penicillium verrucosum* ve *Aspergillus ochraceus* tarafından OTA’nın oluşumu için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 20°C ve 31°C, minimum su aktivitesi değerleri ise 0.80 ve 0.86 olarak bildirilmektedir (Karbancıoğlu ve Heperkan, 2003).

Çeşitli araştırmalar OTA'nın kanserojenik, genotoksik, teratojenik, immunotoksik ve nefrotoksik olduğunu ortaya koymaktadır (Macdonald ve ark., 1999; Temiz ve Özkaya, 2003; Stefanaki ve ark., 2003). İnsanlarda görülen Balkan Endemik Nefropatisi, domuzlardaki Danimarka Böbrek Nefropatisi ve ayrıca fare ve kümes hayvanları embriyosuna teratojenik etkinin nedeni olarak OTA gösterilmiştir. OTA nefrotoksinler arasında en önemlisi olup ilk sırada yer almaktadır. Gelişmiş canlılarda kansere ve kusurlu organ gelişmelerine neden olduğu bilinen OTA'nın hamilelik döneminde bir kez alınması bile doğacak bebeklerde şekil bozukluklarının oluşmasına neden olabilmektedir (Şahin ve Korukluoğlu, 2000; Soyöz ve Özçelik, 2002). OTA Uluslar arası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından 1993 yılında "muhtemel kanserojenik madde (2B)" olarak belirtilmiştir (Abarca ve ark., 2001).

OTA'nın hayvanlarda LD₅₀ değerinin 3.4 ile 30.8 mg/kg arasında değiştiği belirtilmiştir. Vücutta toksinin bir bölümünün eliminasyona uğradığı ilk organ karaciğer olarak bilinmektedir. Daha sonra toksin safrayla atılmakta ve kan dolaşımına girmektedir. Eliminasyonun diğer önemli bir organı ise böbrektir. OTA, bütün nefron segmentlerinden geri emilmekte, bu süreç toksinin böbrek dokusunda birikmesine ve toksisitesinin artmasına neden olmaktadır (Şahin ve Korukluoğlu, 2000; Soyöz ve Özçelik, 2002).

Küfler tarafından OTA gıdada oluşmuşsa, oral yolla alındığı zaman insan dokularında birikme eğilimine sahiptir ve serum yarılanma ömrünün 840 saat olduğu belirtilmektedir. Buna karşın hayvanlarda serum yarılanma ömrünün oldukça düşük olduğu bildirilmektedir (Karagözlü ve Karapınar, 2000; Soyöz ve Özçelik, 2002; Temiz ve Özkaya, 2003; Calvo, 2005).

Sağlık üzerine olumsuz etkileri kanıtlanmış mikotoksinlerle ilgili olarak özellikle WHO (Dünya Sağlık Örgütü), FAO (Gıda ve Tarım Örgütü), Avrupa Birliği, vb. organizasyonların yaklaşımı, teknolojik olarak mümkün olan en düşük değerde toksin içeren ürünün tüketiciye ulaştırılması yönündedir. Bu düşünce tarımsal ürünlerde mikotoksinlerle ilgili maksimum değerlerin daha da aşağıya çekilmesini sağlamıştır. WHO ve FAO'nun gıda katkı maddeleri ile ilgili uzman komitesi (JECFA)'nin 1995'te 44. toplantısında OTA konusunda yapılan

değerlendirmede, tolere edilebilir haftalık miktar olarak 0.1 µg/kg vücut ağırlığı (14 ng/kg vücut ağırlığı/gün'e eşittir) olarak bildirilmiştir (Anonymous, 1995; Soufleros ve ark., 2003; Anlı ve ark., 2005).

OTA, çeşitli hayvan yemlerinde ve etlerinde, baklagillerde, hububat ürünlerinde ve diğer bitkisel ürünlerde, anne sütünde ve çeşitli batı ülkelerinde yapılan çalışmalarda insan kan örneklerinin %80'inde bulunmuş bir mikotoksindir. OTA özellikle bitkisel ürünlerin depolanması sırasında oluşmakta ve besin zincirine girmektedir. Ayrıca domuz dokularında da yaygın olduğu ve OTA düzeyinin hayvansal ürünlerde hububatlardakilerden daha fazla olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan üzüm, kuru üzüm ve şaraplarda OTA varlığı ülkemizin de içinde bulunduğu üzüm yetiştiriciliğinin yaygın olduğu ülkelerde önemli bir sorun haline gelmiştir (Eltem ve ark., 2003).

Avrupa Birliği kuş üzümü, sultani üzüm ve diğer kuru üzümler için tolere edilebilir maksimum OTA seviyesini 10 µg/kg olarak, şarap ve üzüm bazlı içeceklerde ise maksimum OTA sınırı 2 µg/l olarak belirtmiştir (Anonymous, 2006b). Türkiye'de Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nin 2002/63 nolu tebliğinde, kuru üzümde maksimum OTA seviyesi 10 µg/kg olarak belirtilmiştir (Anonymous, 2002; Gürses ve Erdoğan, 2003; Aksoy ve ark., 2003).

Türkiye'de gıda olarak tüketilen bitkisel ürünlerdeki mikotoksin kalıntılarıyla ilgili çalışmalar antep fıstığı, kuru incir, kırmızı pul biber, fındık vb. ürünlerde aflatoksin ve aflatoksijenik küflerin saptanması ile sınırlı kalmış, okratoksinlerle ilgili araştırmalar 1990'lı yıllarda başlamıştır. Ancak bu çalışmaların sayısı da Türkiye'deki OTA problemini açıkça ortaya koyacak kadar çok değildir ve yapılan bu çalışmalar da genelde daha önceki çalışmalarla aflatoksin içeriği açısından dikkatleri üzerine çeken bazı gıda maddelerinde yoğunlaşmıştır (Karagözlü ve Karapınar, 2000).

Çekirdeksiz kuru üzümlerin OTA varlığı açısından sorunlu bir ürün olması ve bu konuda çalışılmaya başlanması, Türkiye ve Yunanistan'dan İngiltere'ye ihraç edilen 1997 yılı ürünü çekirdeksiz kuru üzümlerde yapılan kontrollerde OTA tespit edilmesiyle başlamıştır (Karagözlü ve Karapınar, 2000).

Ülkemizde yapılan araştırmalara göre üzüm yetiştirilen bölgelerdeki çevre koşullarının OTA oluşumu açısından uygun olduğu saptanmıştır (Eltem ve ark., 2003). Buradan yola çıkılarak yapılan araştırmalar sonucunda da hasat öncesi dönemde yağış ve benzeri koşullara maruz kalan yaş üzümlerde OTA oluşumu gözlenmiştir. Sadece yaş üzümde değil aynı zamanda yaş üzümün işlenmesiyle elde edilen başta kuru üzüm; sirke, şarap ve pekmez gibi ürünlerde de OTA'ya rastlanmıştır (Eltem ve ark., 2003).

Olgunlaşmış meyveden yapılan birçok ieeğin (özellikle kuru üzüm suyu, şarap) önemli miktarlarda OTA içerebileceği bildirilmiştir (Markaki ve ark., 2001; Var ve Kabak, 2007).

Ülkemizde yürütölen kapsamlı bir araştırmada farklı özellikler gösteren bağlar seçilip, yapılan költürel uygulamalar, asma ta içi ve dışının meteorolojik değerleri, küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu açısından takip edilmiştir. Bu bağlardan toprak ve 3 farklı dönemde (ben dışma, hasat ve kuru üzüm) alınan üzüm örneklerinde küflerin izolasyonları, tanımlamaları ve OTA üreticisi olup olmadıkları araştırılmıştır. Örneklerin OTA miktarları kantitatif olarak tespit edilmiş olup, araştırma sonucunda OTA'yı çok sayıda küf türünün oluşturabildiği bildirilmiştir (Altındışli, 2003).

Türkiye kuru üzüm ihracatı yönünden dünyada ilk sıralarda yer almaktadır. Türkiye açısından önemli bir ihraç ürünü olan kuru üzüm, 1996-1997 yılı ürünlerinde İngiltere'de yapılan analizlerde ortaya çıkan OTA varlığından dolayı önemli bir problemle karşı karşıya kalmış ve 1997 yılında ihraç edilen ekirdeksiz kuru üzümlerde büyük bir OTA krizi yaşanmıştır (Eltem ve ark., 2003; Heperkan, 2003). Ayrıca ihracatı yapılamayan bu ürünlerin yerel pazara girmesi de göz ardı edilemez bir sorun olarak gündeme gelmiştir.

Mikotoksinler gıdalarda çoğunlukla homojen bir dağılım göstermemektedir. Bu nedenle uygulanacak analitik yöntemde etkin bir örnekleme yapılabilmesi önem taşımaktadır. Mikotoksinler, kompleks kimyasal yapıya sahip organik materyallerde genellikle düşük konsantrasyonlarda (ppb-ppm) bulunabilmektedir. Bu kompleks yapıya sahip organik materyallerden mikotoksinlerin doğru şekilde tespit edilebilmeleri için etkin bir ekstraksiyon ve temizleme işlemine ihtiyaç

duyulmaktadır. Mikotoksinlerin ürünlerden ayrıştırılmasında özellikle son yıllarda kullanılmaya başlanan katı faz ekstraksiyon kolonları hızlı, az solvent kullanımı ve de ekonomik olmaları nedeniyle yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca son zamanlarda kullanılmaya başlanan diğer bir yöntem de mikotoksinlere spesifik monoklonal antikor içeren immunoaffinite kartuşlardır (Smith, 2001).

Ürünlerde OTA belirlemede yaygın olarak daha çok floresans dedektörlü Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılmaktaysa da, ince tabaka kromatografisi (TLC) ve immunokimyasal yöntemlerden (ELISA)'de faydalanılmaktadır. Örneğin, Osrtry ve ark. (2002) TLC yöntemini kullanarak kuru üzümde OTA varlığını araştırırken, Var ve Yalçındağ (2007) ELISA yöntemini, Meyvacı ve ark. (2005), Lombaert ve ark. (2004), Möller ve Nyberg (2003), Stefanaki ve ark. (2003), MacDonald ve ark. (1999) HPLC yöntemini kullanmışlardır.

Çeşitli gıda maddelerinde OTA analizi için resmi/doğrulanmış metotlar bulunmaktadır. TLC ile yapılan iki yöntem dışında bütün doğrulanmış yöntemlerde floresans dedektörlü sıvı kromatografisi temel alınmıştır. Bunun dışında ELISA test kitleri de kabul edilebilir hassasiyette ve birçok gıda ürününde ve tarama amacıyla kullanılabilir. Fakat sıklıkla doğrulama amaçlı sıvı kromatografisine ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni teknolojilerin immunokimyasal tahlillerde kombine kullanılması OTA'nın hızlı bir biçimde kalitatif ve semi-kantitatif sonuçlar elde edilmesi açısından önem kazanmaktadır. Floresans dedektörlü sıvı kromatografisine alternatif olarak LC-MS/MS özellikle multi-mikotoksin analizlerinde önerilmektedir.

HPLC ile yapılan ekstraksiyonların çoğunda performansı yüksek, kesinlik, doğruluk, spesifiklik, hassasiyet ve yeniden üretilebilirlik sağlayan immunoaffinite kolon kullanılmakta ve gıda kontrol ve tarama programlarında da bu kolonlardan yararlanılmaktadır (Visconti ve Girolamo, 2005).

Kuru üzüm yüksek besin değeri nedeniyle dünyada gittikçe artan oranlarda talep görmektedir. Özellikle gelişmiş ülkelerde, sağlıklı gıda tüketimi konusundaki bilincin yüksek olması beslenme alışkanlıklarında bu tip ürünlerin daha fazla yer almasına sebep olmaktadır. Bu açıdan kuru üzüm, gelecek yıllarda, dünya organik gıda pazarından daha büyük paylar alabilecek bir ürün olarak gözükmektedir.

Türkiye çekirdeksiz kuru üzüm ihracatı ile dünyada ilk sırada yer almaktadır. Bu ihracatın %75'i Avrupa Birliği ülkelerine yapılmaktadır. Ancak son yıllarda ortaya çıkan önemli bir mikotoksin olan OTA'nın varlığının üzümlerde görülmesi dışarıda sıkıntılar yaşanmasına neden olmuştur. Bunun yanı sıra, ihracattan dönen ya da toksin bulunması nedeniyle dış pazara gönderilmeyen ürünlerin iç pazarda değerlendirilmesi, özellikle iç pazara yönelik kontrollerdeki eksikliklerden kaynaklanan açıklar yüzünden, önemli sağlık sorunlarını da beraberinde getirmektedir.

Bu çalışmada, sultani kuru üzümündeki OTA sorunu bölgemizde piyasada satışa sunulan kuru üzümündeki OTA varlığının değerlendirilmesi yoluyla ele alınmıştır. Ürünlerde bulunan mikotoksin düzeylerinin pbb düzeylerinde bulunarak sorun yaratması bu ürünlerde toksin arama çalışmalarında hassas yöntemlerle çalışma gereksinimini doğurmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, son zamanlarda sıklıkla ürünlerde toksin arama çalışmalarında kullanılan ve hassas bir cihaz olarak bilinen HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi) ile sultani kuru üzümündeki OTA varlığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**2.1. Mikotoksinler****2.1.1. Mikotoksinler Hakkında Genel Bilgi**

Belirli küfler bazı gıda ürünlerini (olgunlaştırılmış peynir gibi) ve ilaçları (antibiyotikler) insanlara sunarlar; öte yandan zararlı bazı maddelerin de (mikotoksin) sentezinden sorumludurlar (Omaye, 2004).

Küfler tabiatta serbest olarak bol miktarda bulunurlar ve saprofilik özellikleri ile birçok organik maddeyi kullanarak büyüme ve çoğalmaları için gerekli yapıları dışarıya ihtiyaç duymadan sentezleyebilirler. Bu özellikleri sayesinde koruyucu tabakaları zarar görmüş olan bir çok gıda maddeleri üzerinde kolayca kolonize olabilirler. Küfler gıdalarda yumuşamaya neden olan reaksiyonları katalizleyen ekstrasellüler proteolitik ve lipolitik enzimlere sahiptirler (Omaye, 2004). Bu sayede ortama çeşitli enzimler salgılayarak kompleks organik yapıları daha basit yapılara çevirirler. Bu basit yapılar daha sonra küfler tarafından hücre yapıları için gerekli olan katabolik ve anabolik sentezlerde kullanılırlar. Kullanım sonrası ortaya çıkan ürünler birincil ve ikincil metabolitler olarak ikiye ayrılır (Bozoğlu, 2003).

Mikotoksinler; ikincil metabolitler olarak üretilmektedir. Küflerin ve diğer organizmaların birincil metabolitleri, büyümeleri için esansiyel olan metabolitlerdir. İkincil metabolitler ise sentezleyen organizmanın metabolizması ya da gelişimi üzerine belirgin bir öneme sahip olmayıp, eksponansiyel büyüme fazı sonunda oluşmaktadır (Karadeniz ve Ekşi, 2002; Bozoğlu, 2003). Bu tür ikincil metabolitleri uçucu organik maddeler ve mikotoksinler oluşturur. Eksponansiyel fazda üretilen uçucu organik maddeler ketonlar, aldehitler, alkoller ve çoklu modifiye edilmiş aromatik ve alifatik yapılardan meydana gelirler. Araştırmalar uçucu organik maddelerin büyüme ortamı ve şartlarına bağlı olmadan kalitatif olarak kompozisyonlarının aynı kaldığını göstermektedir. Bu tür maddeler özellikle gıda ve büyüme ortamlarında küf kokusu dediğimiz kokuya neden olmaktadır (Bozoğlu, 2003). Küflerde ikincil metabolitlerin sentezlenme yolları; poliketit, terpenoid ve

temel amino asitlerin kullanımı şeklindedir. Mikotoksinler, poliketit yoluyla sentezlenmektedirler (Smith, 2001; Karadeniz ve Ekşi, 2002).

Mikotoksinlerin kimyasal yapıları incelendiğinde çoğunun aromatik yapıda olduğu, daha az bir kısmının da alifatik bileşiklerden oluştuğu görülür. Genellikle yüksek sıcaklıklara dirençlidirler, mikotoksin çeşitlerine, sıcaklık derecelerine ve uygulama sürelerine göre farklı kararlılık gösterirler. Genellikle kendilerinin sentezledikleri toksinlerden olumsuz etkilenmezler. Mikotoksinler bakteri toksinlerinin aksine küçük molekülü bileşikler olduğundan bunların immunolojik yöntemlerle belirlenmesinde, bir antijenin değişik epitoplara bağlanan ve dolayısıyla V domainleri farklı olan çeşitli antikorları içeren, poliklonal antikorlar (antiserumlar) yeterli olur. Oysa bakteriyel toksinlerin belirlenmesinde, tek bir B lenfosit hücresi tarafından üretilen ve antijenin sadece bir epitopuna bağlanabilen, monoklonal antikorlara gereksinim duyulmaktadır. Bazı mikotoksinler endotoksin olarak misel içinde birikirken, birçoğunun miselden substrata doğru salgılandığı ve difüze olduğu görülür. O nedenle küflü gıda ve yemlerden miseller uzaklaştırılsa bile ürünün mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmaz (Anonymous, 2006a).

Mikotoksinler kelime anlamı olarak kullanımında kural dışı bir kullanım söz konusudur. Zootoksin ve fitotoksin anlam olarak sırasıyla hayvan ve bitkilere karşı toksik etki gösteren anlamına gelirken, mikotoksin ise, küflere karşı toksik etki gösteren anlamı yerine, küfler tarafından üretilen ve hayvanlara karşı toksik özellik gösteren madde olarak kullanılmaktadır (Smith, 2001). Küfler tarafından yaşayan bir dokunun istilası mikosis olarak adlandırılmakta iken, mikotoksinler tarafından oluşturulan hastalık mikotoksikosis olarak adlandırılmaktadır (Karadeniz ve Ekşi, 2002).

Günümüzde 100'den fazla küfün 400 civarında toksijenik etkiye sahip ikincil metabolitler ürettikleri rapor edilmiştir (Kabak ve ark., 2006). Bunlardan çok az bir kısmı yaygın olarak görülmektedir. Mikotoksinlerin ortaya çıkma sıklıkları ülke ve bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte (Oruç, 2005); dominant mikotoksinler olarak, *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu aflatoksinler, *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin oluşturduğu OTA ve patulin, *Fusarium* cinsine giren küflerin ürettikleri

mikotoksinler (örn. deoxynivalenol, zearalenone, T-2 ve HT-2 toksinleri) ve fumonisinler sıralanabilir (Krska ve Molinelli, 2007).

1930 ve 1940'lı yıllarda küf kaynaklı antibiyotik olarak çalışılan birçok madde, bugün yüksek canlılara gösterdikleri toksik etkiler nedeniyle mikotoksin olarak sınıflandırılmıştır. Esas olarak protein yapısında ve antijen özellikte olan bakteriyel toksinlerin aksine, mikotoksinler çok çeşitli kimyasal yapı ve biyolojik aktiviteye sahip maddelerdir. Küflerin hemen her yerde bulunabilmeleri ve birçok gıda ve yem maddesinde gelişerek toksinlerini oluşturabilmeleri nedeniyle, mikotoksinler çok önemli doğal toksinler olarak kabul edilmektedir (Temiz ve Özkaya, 2003).

Mikotoksinler; çeşitli risklerle tehlike kaynağı oluşturmaktadırlar. Bunlar; sağlık kayıpları, kalite kayıpları ve ekonomik açıdan karşılaşılabilen riskler olarak özetlenebilir. Küfler ve mikotoksinleri bu risklere bağlı bazı akut veya kronik sorunlar yaratabilirler (Topal, 2003). İnsanlarda ve hayvanlarda mikotoksin alımının toksik etkileri alım miktarı, toksin türü, etki mekanizması, metabolizma ve immun sistemi gibi bir çok etkene bağlıdır (Kabak ve ark., 2006). Mikotoksin alımının neden olduğu başlıca sağlık sorunları olarak; kanserojenik, teratojenik (embriyonal zararlanmalar), tremorgenik (titreme ve refleks kayıpları sorunları), hemoraljik (doku ve organlarda kanama sorunları), dermatitik (deride lezyonlar), hepatoksik (karaciğer zararlanmaları), nefrotoksik (böbrek sisteminde zararlanmalar), nörotoksik (sinir sistemi zararlanmaları) vb. olumsuzluklar örnek olarak sayılabilmektedir. Ayrıca ölüme sebep olabilen akut riskler de taşımaktadırlar. Mikotoksinler üretici küfleri tarafından kontamine ürünlerde yetiştirme sürecinde, hasat sırasında, ürünün işlenmesi, işlemeyi izleyen evrede ya da depolama evresinde, ürünlere bulaşabilmektedir. Hayvanlar da toksin riskinin bulaşması bakımından doğrudan tehlike taşıyan faktörler olabildiği gibi, yaşamdaki büyüme sürecinde veya tüketim esnasında doğal biyo-döngü ile bağlantılı olarak, toksik maddelerin tüketiciye geçişinde etken faktör olabilmektedirler (Topal, 2003).

2.1.2. Mikotoksikozis Ve Neden Olan Küfler

Günümüzde tarım ürünlerinin %25'nin her yıl değişik oranlarda mikotoksin içerdiği ve önemli ekonomik sonuçları olduğu bildirilmektedir. US ve Kanada'da sadece yem ve çiflik endüstrilerinde mikotoksin kaynaklı yıllık ortalama 5 milyar dolar ekonomik kayıp tahmin edilmektedir (Smith, 2001).

1800 sonları ve 1900 başlarında araştırmacılar küfler tarafından üretilen bir çok ikincil metabolitin farkına varmışlardır. 1928 yılında Alexander Fleming'nin penisilini keşfinden sonra, araştırmacılar antibiyotikler üzerine çalışmalarını artırmışlardır. Bilim adamları bu araştırmaları yaparken bazı küf metabolitlerinin hayvanlar üzerine toksik etki gösterdiğinin farkına varmasıyla, bilim dünyası insanlar ve diğer hayvanlar üzerine hastalıklara neden olan mikotoksinlerle ilgili ilk ipuçlarını elde etmişlerdir (Richard, 2007).

Tahılların depolanması sonucu ortaya çıkan problemler ve bunun üzerine yapılan çalışmalar ile birlikte, küfler tarafından tahıllarda ortaya çıkan bozulmalar çiftliklerde ve insanların tüketimi sonucu ortaya çıkan toksik problemler daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. 1940 ve 1950'lerde İkinci Dünya Savaşı öncesi yıllarda Rusya'da insanlarda ölümcül hastalıklar ortaya çıkmış ve bu durum incelendiğinde "Alimentary Toxic Aleuka (ATA)"yı tanımlamışlardır. Bu yıkıcı hastalık, kanama ve merkezi sinir sistemi etkileri sonucu sıklıkla ölümle sonuçlanması, bu hastalığın küf kontaminasyonuna uğramış tahıllarda önemini ortaya koymuştur. Ancak toksik etkiye sebep olan bileşikler o zamanlar bulunamamıştır. Daha sonraları T-2 toksininin neden olduğu ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda yine Rusya insan ve atları etkileyen başka bir hastalıkla uğraşmaktadır. 1930'larda bu hastalık binlerce atın ölümüyle sonuçlanmıştır. Sonunda neden olan küf *Stachybotrys atra*, (günümüzde *S. chartarum* olarak bilinir) olarak tespit edilmiş ancak, ATA'ya benzer semptomları olması nedeniyle kafa karışıklığına neden olmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarla şimdilerde trikotesenler olarak bildiğimiz bu iki bileşiğin benzer yapıya sahip olduğu anlaşılmıştır. Benzer durumun Birleşik Devletler'de de ortaya çıkması mikotoksinlere ve mikotoksikozise sistematik bir yaklaşımın ortaya çıkmasına neden olmuştur. Modern mikotoksikoloji 1961'de İngiltere'de 100.000'den fazla hindinin

ölümüyle sonuçlanan ve “Hindi X” hastalığı olarak adlandırılan aflatoksinlerin keşfiyle başlamıştır. Daha sonraları aflatoksinlerin sadece bir depolama sorunu olmayıp kanserojen ve immun sisteme etkilerinden dolayı mikotoksin problemi analitik kimya, mikrobiyoloji, ziraat, entomoloji, genetik, medikal, veteriner vb. bilimlerinin de ilgilendiği multi-disipliner bir sorun olarak görülmeye başlanmıştır (Richard, 2007).

Başlıca mikotoksin üreticilerinden *Alternaria* ve *Fusarium* cinsleri tarla küfleri, *Penicillium* ve *Aspergillus* ise depo küfleri olarak sınıflandırılabilir. Her ürünün yapısına, bileşimine, içerdiği nem oranına, bulunduğu klima koşullarına göre ürünün üzerinde gelişen küf cinsleri, türleri, oranları, oluşturdukları mikotoksin çeşitleri ve miktarları değişiklik gösterebilmektedir (Anonymous, 2006a). Çizelge 2.1.’de önemli mikotoksinler, üretici küfleri, sorun yarattığı ürünler ve etkileri verilmiştir (Doyle ve ark., 1997; Golob, 2007).

Bir depo küfü olan *Aspergillus* tarafından üretilen aflatoksinler, üzerinde en çok çalışılan, doğada en yaygın rastlanılan ve özellikle tropikal, semi-tropikal bölgelerde ortaya çıkan önemli bir toksin olup aflatoksinler içerisinde en toksik olanı aflatoksin B1 olarak bilinmektedir. Diğer bir önemli depo küfü ise *Penicillium*’dur. Yüksek sıcaklık ve neme sahip tropik bölgeler, bu iki küf cinsinin hasat öncesinde ürünlerde gelişebilmesine sebep olabilmekte ve ürüne bir kez kontamine olduktan sonra ürünün kurutulma sürecinde de üründe önemli hasarlara neden olabilmektedirler. Her iki cins küf, aynı zamanda OTA üretiminden sorumlu *P. verrucosum* ve *A. ochraceus* gibi türleri de içermektedirler (Golob, 2007).

Patojen bir küf olan *Fusarium* bitkilerin büyümesi sırasında ortaya çıkar ve 70’den fazla farklı toksin üretir. Bunlardan en önemlileri fumonisin, deoksinivalenol (DON), zearalenone ve trikotesenler (T-2 toksin veya vomitoksin)’dir ve ayrıntılı bir şekilde son zamanlarda çalışılmaya başlanmıştır. Bazı *Fusarium* türleri 17 farklı mikotoksini eş zamanlı olarak üretebilmektedirler (Golob, 2007).

Fusarium Afrika, Asya ve Kuzey ve Güney Amerika’da tahıllarda (buğday, arpa, mısır) bozulmaya neden olan baskın bir küftür. *Fusarium* genellikle 0.88 üzerinde su aktivitesine ihtiyaç duymaktadır. Uygun bir depolama ile danelerdeki nem içeriği %13.5-14’ü geçmeyecek şekilde kurutulup, temizliği iyi yapılmış

silolarda 10-15°C'de tutulurlarsa kontamine olmuş danelerdeki tarla küflerinin gelişmeleri ve toksin oluşturmaları önlenmektedir. Ayrıca oluşmuş mikotoksinlerden trikotesenler depo koşullarında metabolize olup tamamen parçalanabilmektedirler (Anonymous, 2006a; Golob, 2007).

Çizelge 2.1. Önemli mikotoksinler, üretici küfleri, sorunlu ürünler ve etkileri (Doyle ve ark., 1997; Golob, 2007).

Mikotoksin	Üretici Küf	Ürün	Memeli Hayvanlara Etkileri
Aflatoksin	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Mısır, buğday ve yerfıstığı, kabuklu yemişler, incir, baharatlar, soya fasulyesi, pamuk tohumu yağı, palm çekirdek, kurutulmuş hindistan cevizi, süt ve süt ürünleri (M ₁)	hepatotoksik, kanserojen, teratojen (AFB ₁).
OTA	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> <i>P. verrucosum</i> <i>P. citrinum</i>	Tahıl ve tahıl ürünleri, bakliyat, kuru meyveler , içecekler, baharatlar, yerfıstığı	nefrotoksik, hepatotoksik, teratojen, immunosupresif
Sitrinin	<i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. verrucosum</i>	Buğday, çavdar, pirinç, mısır, meyve suları	nefrotoksik, nörotoksik
Patulin	<i>Pen. Expansum</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>	Küflü meyve, sebze, tahıllar ve diğer gıdalar	Nörotoksik, hücreye toksik
Sterigmatosistin	<i>A. versicolor</i> , <i>A. rugolosis</i>	Hububat, kahve	Kanserojen
Trikotesenler (T-2 Toksin)	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>	Buğday, mısır, saman	Düşük dozlarda kusma, lökopeni, deri nekrozları.
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i>	Mısır, buğday, arpa, yulaf	Östrojen benzeri etki.

Dünya Sağlık Örgütü–Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (WHO–IARC) tarafından, mikotoksinler insanlara karşı kanserojenik potansiyellerine göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre; aflatoksin B₁ (AFB₁), “yeterli kanıt elde edilmiş insan kanserojenleri” (1A grubu) grubunda yer alırken, aflatoksin M₁ ve OTA “muhtemel kanserojenik mikotoksin” (2B grubu) grubunda yer almıştır (Sage ve ark., 2004). Diğer yandan trikotesen ve zearalenon için insanlara karşı kanserojenik etkisinin bulunmadığı (3B grubu) belirtilmiştir (Kabak ve Var, 2006).

2.1.3. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Küflerin çoğalması ve mikotoksin üretimi küf türü, bitki ve çevre etkenlerinin kombinasyonu sonucu meydana gelir. Gıda ve yemlerde gelişen küflerin gelişme sürecini tamamladıktan sonra miselleri içerisinde oluşturdukları ve birçok durumda üzerinde buldukları ürüne (substrata) salgıladıkları toksik metabolitler oluştururlar. Mikotoksin üretimini etkileyen başlıca faktörler aşağıda sıralanmıştır (Bozoğlu, 2003; Anonymous, 2006a).

- a) Mikotoksinler belirli türler tarafından üretilmektedirler;
- b) Mikotoksin miktar ve türünde büyüme ortamının etkisi bulunmaktadır;
- c) Mikotoksin üretimi mevsime ve yaşam döngüsüne göre değişebilmektedir;
- d) Ortamda diğer yarışmacı mikroorganizmaların olması toksin üretimini aktive etmektedir;
- e) %70 den fazla nem ve 12–47 °C arasındaki sıcaklık mikotoksin üretimi için optimum koşulları sağlar;
- f) Mekanik işlemlerin ve böceklerin bitkilerdeki koruyucu yapıyı bozmaları küf üremesinin artmasına ve mikotoksin üretilmesine sebep olabilmektedirler;
- g) Yetersiz gübreleme ve kuraklık sebebi ile bitkilerdeki koruma sistemlerinin zarar görmesi küflerin bitkide kolayca kolonize olmasına ve mikotoksin üretmesine yol açabilmektedir.

Dış etkenlerin mikotoksin üretimi üzerindeki etkinlikleri bilinmesine rağmen bu toksinlerin biyokimyasal sentezleri tamamıyla anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalar toksin üretimi için birçok genin bulunduğunu ve bu genleri aktive ederek toksin sentezleme mekanizmalarını başlatacak aktivatör veya durduracak deaktivatör kimyasalların olduğunu göstermektedir

Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda elde edilen mikotoksin yapılarında bulunan kimyasallar aşağıda verilmiştir.

Aflatoksinler	: kumarin ve difuran
Okratoksin	: fenil alanine ve izokumarin
Lumpidin	: antralik asit, glutamin triptofan ve homoprolin
Patulin ve citrinin	: acetyl-CoA ve 3malonil-CoA
Fumosin	: poliketidler, glutamik asit, methionin ve serin

Yapılan bu çalışmalarda küflerin mikotoksin üretiminde sahip oldukları sentezleme becerileri özellikle poliketid sentezleme becerisi, mikotoksin üretime önemli bir işlev kazanmaktadır. Bu sayede küfler asetil-CoA ve suksinil-CoA gibi basit kimyasallardan başlayarak kompleks mikotoksin yapılarını sentezleme kabiliyeti edinmişlerdir (Bozoğlu, 2003).

2.2. Okratoksin A

Okratoksinler başta *Penicillium verrucosum*, ve *Aspergillus ochraceus* tarafından üretilmekte olup düşük miktarda *Aspergillus niger*'in de OTA sentezleyebildiği rapor edilmiştir (Creppy, 2002). Okratoksinler A, B ve C olmak üzere birbirinden kimyasal yapıları çok az farklı olan gruplardan oluşmaktadır. İçlerinde en yaygın bulunan, bu nedenle de en çok tespit edilen, ayrıca en toksik özellik gösteren OTA'dır (Anonymous, 2006c).

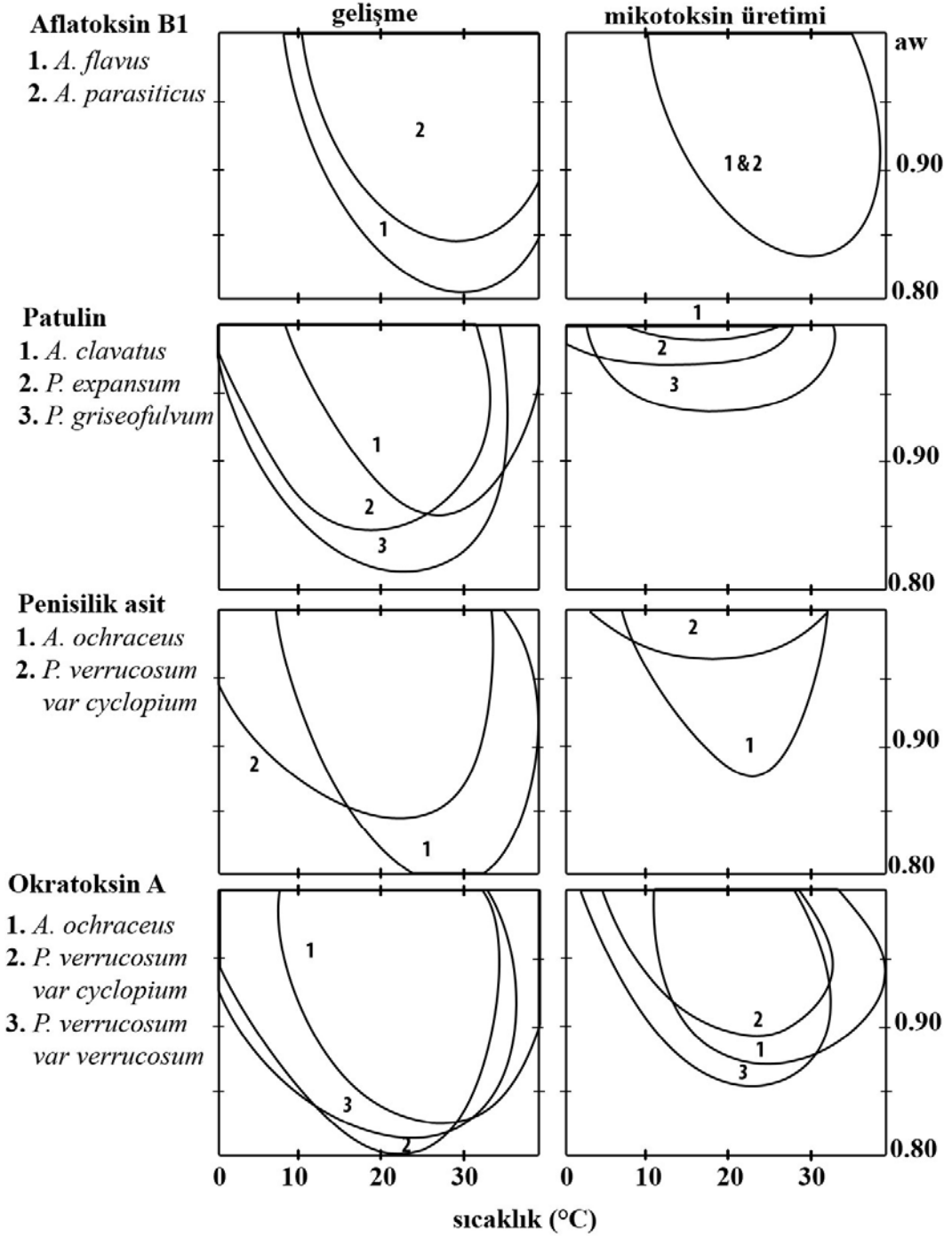
Okratoksin A ve daha az toksik dekloro analogu olan Okratoksin B ilk kez 1965 yılında Güney Afrika'lı kimyacılar tarafından tanımlanmış ve D.B. Scott

tarafından sorgum tanelerinden izole edilen *Aspergillus ochraceus* K-804 susundan izole edilmiştir (Karagözlü ve Karapınar, 2000).

Tarlada gelişmekte olan tahıllarda OTA üreticisi olan küflerin üründe bulunması ile ilgili koşullar hakkında az bilgi bulunmaktadır. OTA'nın üzüm gibi bazı ürünlerde depolama öncesi bağlarda ortaya çıkması hariç, OTA üreticisi küfler ve toksin üretimi için depolama koşullarının daha uygun olduğu düşünülmektedir (Richard, 2007). Farklı gıdalarda OTA ortaya çıkması ürünün görünüşünde meydana gelen küf gelişiminin tarifinde zorluklara neden olmaktadır. Ancak belirgin bir biçimde küf gelişimi olan gıdalarda *A. ochraceus*'un sarımsı, *Penicillium* cinsi küflerin mavi-yeşil ve *A. niger*'in siyah renk oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir (Richard, 2007).

Soğuk ve ılıman bölgelerde OTA başlıca *Penicillium verrucosum* veya *P. nordicum* tarafından üretilir. *Penicillium verrucosum* tahıl ürünlerini kontamine ederken, *P. nordicum* ise et ürünleri ve peynirlerde tespit edilmiştir. Tropikal ve yarı-tropik bölgelerde, OTA *Aspergillus ochraceus* tarafından üretilmektedir Şekil 2.1.'de değişik küflerin gelişmesi ve mikotoksin Üretmesi için sıcaklık ve su aktivitesi koşulları (Samson ve Hoekstra, 1988) verilmiştir. *Aspergillus ochraceus*'un kuruyemişler, yerfıstıkları, tohumlar, baharatlar, yeşil kahve tohumlarında ve kurutulmuş meyvelerde olduğu gibi işlenmiş et ürünleri ve tütsülenmiş ve salamura balık ürünleri gibi pek çok ürünleri kontamine ettiği rapor edilmiştir. *Aspergillus* section *Nigri*'nin diğer iki türü *A. niger* var *niger* ve *A. carbonarius*'un da OTA üreticisi olduğu bildirilmektedir. İliman bölgelerde, *A. carbonarius* yaş ve kuru üzüm ve kahvede sorun yaratırken tahıllar, yağlı tohumlar ve yem karışımları gibi ürünler *A. ochraceus*'un yanı sıra, *A. niger* var *niger* tarafından da kontamine edilebilmektedir. Son zamanlarda Samson ve ark., (2004) iki yeni (*A. lacticoffeatus* ve *A. sclerotioniger*) OTA üreten *Aspergillus* türünü kahve tohumlarından izole etmişlerdir. Ek olarak bir başka *Aspergillus* türü olan *A. alliaceus* (*Petromyces alliaceus*) laboratuvar ortamında soğanlardan izole edilmiş ve OTA üreticisi olarak bildirilmiştir (Ringot ve ark., 2006). Okratoksin gıdalarda genellikle sitrinin ve penisilik asitle veya başka mikotoksinlerle beraber görülmektedir. Çünkü okratoksin üreticisi *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri yan metabolitler olarak birkaç mikotoksini

daha eş zamanlı sentezleyebilmektedirler. Çizelge 2.2.'de Okratoksin üreten küflerin oluşturdukları diğer mikotoksinler gösterilmiştir (Anonymous, 2006a).



Şekil 2.1. Değişik küflerin gelişmesi ve mikotoksin üretmesi için sıcaklık ve su aktivitesi koşulları (Samson ve Hoekstra, 1988).

Çizelge 2.2. Okratoksin üreten küflerin oluşturdukları diğer mikotoksinler (Anonymous, 2006a).

OTA üretici fungus türü	Üretmiş oldukları diğer mikotoksinler
<i>Aspergillus alliaceus</i>	Kojikasit, penisilik asit
<i>A. glaucus</i> (<i>Eurotium</i> spp.)	Kojikasit
<i>A. melleus</i>	Penisilik asit
<i>A. ochraceus</i>	Penisilik asit, viomellein, ksantomegnin
<i>A. ostianus</i>	Penisilik asit
<i>A. petrakii</i>	Penisilik asit
<i>A. sclerotiorum</i>	Penisilik asit
<i>A. sulphureus</i>	Penisilik asit
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Patulin, penisilik asit, penisilin
<i>P. puberulum</i>	Penisilik asit
<i>P. crustosum</i>	Viomellein, ksantomegnin
<i>P. aurantiogriseum</i>	Siklopiazonikasit, patulin, sitrinin, penisilik asit, viomellein, ksantomegnin, rugulosin
<i>P. palitans</i>	Sitrinin, penisilik asit, penitrem A
<i>P. purpurescens</i>	Sitrinin, penitrem A
<i>P. purpurogenum</i>	Rubratoksin A, rubratoksin B
<i>P. variabile</i>	Patulin, rugulosin
<i>P. verrucosum</i>	Penisilik asit
<i>P. viridicatum</i>	Penisilik asit, sitrinin, viomellein, ksantomegnin, siklopiazonikasit, penitrem A, griseofulvin

OTA üretimi çeşitli faktörlere (sıcaklık, su aktivitesi, substrat kopozisyonu vb.) bağlıdır. Okratoksin üreten küfün cinsine göre de su aktivitesi ve sıcaklık istemleri değişebilmektedir. Örneğin, *P. verrucosum* ve *A. ochraceus* tarafından OTA'nın oluşumu için optimum sıcaklık değerleri sırayla 20°C ve 31°C, minimum su

aktivitesi değerleri ise 0.80 ve 0.86 olarak bildirilmektedir (Creppy, 2002; Karbancıoğlu ve Heperkan, 2003).

Hocking ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada; kurutma işlemi sırasında *A. carbonarius*'un *A. niger*'e göre oransal olarak artışını gözlemlemişler ve kuru üzümün şaraplık üzümlere göre daha yüksek OTA içerme riski oluşturabilecekleri üzerine vurgu yapmışlardır. Nadiren OTA üreticisi olarak gösterilen *A. niger* hasat zamanına kadar üzümlerde baskın tür olarak bilinirken, kurutma işlemi sırasında *A. carbonarius*'un hemen hemen bütün suşlarının OTA üretebildiği gösterilmiştir. Toksin üretimi için sıcaklığın soğuk oluşu bir avantaj oluşturmaktadır. 30°C'nin üzerindeki kurutma işlemleri potansiyel OTA üretimini düşürmektedir. Su aktivitesinin güvenilir sınırlara gelmesiyle toksin oluşu engellenmiş olur.

Valero ve ark. (2005) tarafından, farklı olgunlaşma evrelerinde güneşte-kurutulmuş kuru üzümün küf içeriği incelenmiş ve izolatların teşhisi yapılmıştır. Üzümlerde *Aspergillus nigri* oluş sıklığı ile olgunlaşma arasında pozitif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada 5 izolat (*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium decumbens*, *Aspergillus carbonarius*, *A. niger* ve *A. nigri*) sentetik besi ortamına (üzümün kompozisyonuna benzer) farklı a_w ve sıcaklıklarda 18 gün inkübe edilmiştir. *Aspergillus nigri* geniş bir sıcaklık ve a_w aralığında gelişmiş, test edilen birçok koşul altında diğerlerine göre daha yüksek büyüme oranına sahip ve genellikle baskın davranış göstermiştir. *Aspergillus nigri* varlığı sıcak ve nem koşullarına toleransından dolayı üzümlerde hasat ve güneşte-kurutma süresince baskın olmuştur. Elde ettikleri veriler ışığında, kurutma periyodunun süresinin son ürünün kalitesini bozmadan mümkün olduğunca kısa tutulması veya üzümün kurutmasını kontrollü ortamlarda kuru sıcak hava akışı ile sağlanmasını önermişlerdir.

Markaki ve ark. (2001) olgunlaşmış meyveden yapılan birçok içeceğin (özellikle kuru üzüm suyu, şarap) önemli miktarlarda OTA içerebileceğini ayrıca; Türkiye ve Yunanistan'dan temin edilen kuru üzüm çeşitlerinde OTA tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Altındışli (2003) kuru üzümde sorun olan OTA konusunda ülkemizde yürütülen kapsamlı bir araştırmada farklı özellikler gösteren seçilmiş bağların

özelliklerinin, yapılan kültürel uygulamalar, asma taç içi ve dışının meteorolojik değerleri, küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu açısından takip edildiğini bildirmiş, bu bağlardan toprak ve 3 farklı dönemde (ben düşme, hasat ve kuru üzüm) alınan üzüm örneklerinde küflerin izolasyonları, tanımlamaları ve OTA üreticisi olup olmadıklarının araştırıldığı bu çalışmada ayrıca örneklerde OTA miktarları kantitatif olarak da tespit edilmiştir. Çalışmalar sonucunda OTA'nın çok sayıda küf türü tarafından oluşturulabildiği gösterilmiştir

OTA sindirim sisteminden absorbe olabilmektedir. Birçok türde OTA kan yoluyla, başlıca böbreklerde, düşük konsantrasyonlarda karaciğerde, kas ve yağlarda dağılım göstermektedirler. Yapılan çalışmalarda, OTA'nın fare, tavşan ve insan sütüne geçtiği gözlenirken, işkembenin mikroflorasından dolayı geviş getiren hayvanlarda OTA'nın az bir kısmının süte geçtiği gözlenmiştir (Creppy, 2002).

Bulgaristan, Yunanistan, Romanya ve Yugoslavya gibi bazı ülkelerde görülen Balkan nefropatisi (kronik böbrek hastalığı) olarak adlandırılan öldürücü böbrek hastalığının nedeni, domuzlarda Danimarka Böbrek Nefropatisi ve ayrıca kümes hayvanlarındaki önemli bir sağlık sorununun muhtemel kaynağının OTA olduğu belirlenmiştir (Karagözlü ve Karapınar, 2000; Battilani ve Pietri, 2002). Bunun yanısıra OTA'nın bütün hayvan türleri için kuvvetli bir nefrotoksik olduğu ve kanserojenik, teratojen etkiye sahip, immunosupresif, genotoksik, akut ve kronik etkili, bir bileşik olduğu bildirilmektedir (Cabanès ve ark., 2002; Battilani ve Pietri, 2002).

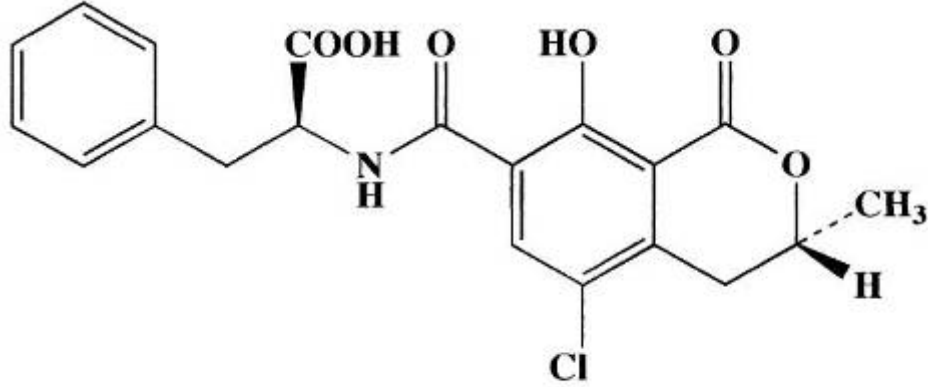
Okratoksin üreticisi küfler normal koşullar altında Okratoksin A ve B oluştururlar. Okratoksin B'nin, Okratoksin A'dan daha az toksik olduğu bu nedenle de karaciğer hücrelerinde protein biyosentezini inhibe etmediği bilinmektedir. OTA'nın daha toksik olmasına neden olarak da dihidro-metil-izokumarin halka sistemindeki C5 üzerinde bulunan klor atomuna fenolik OH eklenmesi ve toksisitenin bu şekilde arttığı bildirilmektedir. Okratoksin B'de bu klor atomunun bulunmaması bu metabolitin OTA'ya nispeten daha az toksik olmasını sağlamaktadır. Okratoksinlerin kimyasal yapılarını oluşturan fenilalanin ve dihidroizokumarin bileşiklerinin, amid bağı ile birbirlerine bağlanmaları ısıya ve

hidrolize karşı çok kararlı bir yapı kazanmalarına neden olur (Petzinger ve Ziegler, 2000).

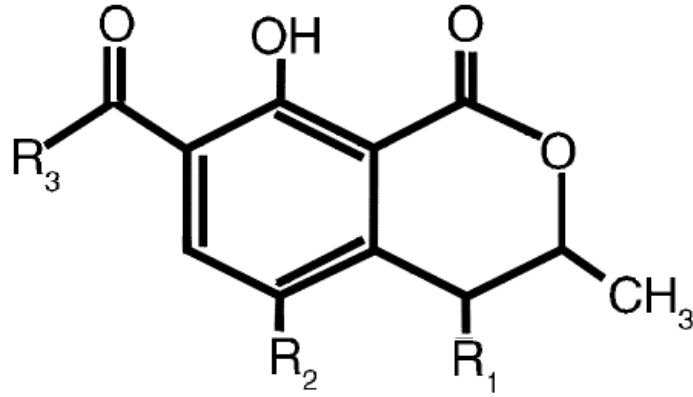
OTA kısmen kararlı bir molekül olup, bir çok gıda işleme yöntemlerine karşı dirençli olmasından dolayı tüketim ürünlerinde ortaya çıkmaktadır. Gıda işleme yöntemleri kaynatma, fırınlama, kurutma, fermantasyon vb. işlemleri içermekte ve OTA'nın parçalanmasında ayrıca pH, sıcaklık ve diğer parametrelerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Pişirme ve ekmek yapımında OTA'nın ne derecede parçalanabildiği gözlenmiş ve OTA'nın yalnızca %20 gibi oranda parçalanabildiği gözlenmiştir. Ancak tahıllara uygulanan fiziksel işlemler özellikle öğütme öncesi yapılan temizleme işlemleri sonucunda buğday ununda OTA düzeyi %50 oranında azalmıştır (Anonymous, 2006c).

OTA'nın yarılanma ömrü geniş getiren hayvanlar dışındaki memelilerde (örn. farelerde 24–39, sıçanlarda 55–120 saat, domuzlarda 72–120 saat, Güney Afrika maymunlarında 456–504 saat) uzun sürmektedir. Gönüllü insanlarda OTA'nın yarılanma ömrü ile ilgili yapılan çalışmalarda ise bu süre 840 saat olarak bildirilmiştir (Creppy, 2002).

OTA'nın deneysel formülü $C_{20}H_{18}O_6NCl$ (Şekil 2.2.) ve moleküler ağırlığı 403.82'dir. CAS numarası 303–47–9'dur. Şekil 2.3.'de Okratoksin A, Okratoksin B, Okratoksin C, 4-hidroksiokratoksin A ve Okratoksin α 'nın kimyasal yapısı, onları açıklayıcı çizelgesiyle gösterilmiştir (Ringot ve ark., 2006). OTA renksiz, kristalimsi, polar organik solventlerde yüksek çözünürlüğe sahip, suda az çözünen fakat sulu sodyum hidrojen karbonatlı çözeltilerde çözünebilen bir bileşiktir. Zayıf asidik özellik göstermektedirler (Ringot ve ark., 2006).



Şekil 2.2. Okratoksin A moleküler yapısı



Okratoksinler	R1	R2	R3
OTA	H	Cl	-NH-CH(COOH)-CH ₂ - Phenyl
OTB	H	H	-NH-CH(COOH)-CH ₂ - Phenyl
OTC	H	Cl	-NH-CH(COOC ₂ H ₅)-CH ₂ -Phenyl
4-hidroksiokratoksin A	OH	Cl	-NH-CH(COOH)-C ₂ H- Phenyl
OT α	H	Cl	-OH

Şekil 2.3. Okratoksin A, Okratoksin B, Okratoksin C, 4-hidroksiokratoksin A ve Okratoksin α 'nın kimyasal yapısı (Ringot ve ark., 2006).

Benzen ve ksilen ile yeniden kristalize edilebilir. Kristal formda ultraviyole altında ve asit solüsyonda yeşil, alkalın solüsyonda mavi fluoresans verir. Benzen ve ksilen kristallerin erime noktası sırasıyla 90°C ve 171°C'dir (Park ve ark., 2000; Temiz ve Özkaya, 2003; Ringot ve ark., 2006). Işığa ve özellikle nemli koşullara maruz kaldığı zaman bozulabilir ve etkisini kaybedebilir. Etanol solüsyonunda,

karanlık ve soğukta muhafaza edildiği zaman bir yıldan fazla stabil kalabilir. OTA sığağa karşı da oldukça stabildir (Soyöz ve Özçelik, 2002).

WHO ve FAO'nun gıda katkı maddeleri uzman komitesi (JECFA)'nin 1995'te 44. toplantısında OTA konusunda yapılan değerlendirmede, tolere edilebilir haftalık OTA miktarı olarak 0.1 µg/kg vücut ağırlığı (14 ng/kg vücut ağırlığı/gün'e eşittir) verilmiştir (Anonymous, 1995; Anlı ve ark., 2005).

Avrupa Birliği'nin kuş üzümü, sultani kuru üzümü ve diğer kuru üzümler için tolere edilebilir maksimum OTA seviyesi 10 µg/kg olarak, şarap ve üzüm bazlı içeceklerde izin verilen maksimum OTA sınırı 2 µg/l olarak belirlenmiştir (Anonymous, 2006b). Türkiye'de Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nin 2002/63 nolu tebliğinde, kuru üzümde maksimum OTA seviyesi 10 µg/kg olarak belirtilmiştir (Anonymous, 2002).

2.3. Kuru Üzüm

Asma, dünya üzerinde kültürü yapılan en eski meyve türlerinden birisidir. Yeryüzünde bağcılığın tarihçesi M.Ö. 5000 yılına kadar dayanır. Asmanın anavatanı Anadolu ve Kafkasya'yı içine alan ve Küçük Asya olarak adlandırılan bölgedir (Nazlı, 2007). Dünyada bağcılık, genel olarak Kuzey Yarımkürede 20°-50°, Güney Yarımkürede ise 20°-40° enlemleri arasında yapılmaktadır. Sıcaklık, bağcılığın kuzeye doğru yayılmasını engelleyen en önemli faktördür (Taşkaya, 2003).

Asma, diğer meyvelerle kıyaslandığında en fazla çeşide sahip olan türlerden biridir. Dünyada 10.000'nin üzerinde üzüm çeşidi olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye ise asmanın anavatanı olması nedeniyle 1.200'ün üzerinde üzüm çeşidine sahiptir. Fakat bunlardan ancak 50-60 kadarının ekonomik önemi olup, geniş çapta yetiştirilmektedir (Nazlı, 2007). Anadolu'da yetiştirilen üzümlerin çoğu kuru ve yaş olarak tüketilmekle birlikte bir kısmı da şarap, pekmez, bulama, pestil, lokum, vb. olarak değerlendirilmektedir (Taşkaya, 2003).

Üzüm, yüksek şeker içeriğinden dolayı, kalori değeri yüksek bir besin maddesidir. Ayrıca mineral maddelerden kalsiyum, potasyum, sodyum ve demir yönünden zengin olduğu gibi bazı vitaminler (A, B1, B2, Niacin ve C vitaminleri)

yönünden de önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Bazı karaciğer hastalıkları ile kansızlığın tedavisinde etkili olan üzüm, yüksek tansiyonu kontrol altında tutmaktadır. Ayrıca içerdiği meyve asitleri ve lifli yapısı ile mideye zarar vermeden böbrek ve bağırsak sisteminin çalışmasını düzenler, kanın temizlenmesine yardımcı olur. Diğer yandan, yüksek kalori içeriğine karşın, çok düşük miktarlarda yağ ve protein içerdiğinden ideal bir diyet besinidir (Taşkaya, 2003; Nazlı, 2007).

Üzüm, iklim ve toprak istekleri yönünden çok seçici olmayışı, çoğalma yöntemlerinin kolay oluşu ve çok çeşitli şekillerde tüketilebilmesi gibi sebeplerden dünyadaki en yaygın kültür bitkilerinden birisidir. Dünya yaş üzüm üretimi yaklaşık 7.5 milyon hektar alanda gerçekleştirilmekte olup, üretim miktarı, iklim şartlarına bağlı olarak değişmekle birlikte, yıllık 65 milyon ton civarında seyretmektedir (Nazlı, 2007).

Dünya üzüm üretimi, kuru, şaraplık, yaş ve farklı taleplere bağlı olarak değerlendirilmektedir. Dünyada üretilen üzümlerin her yıl yaklaşık 700–800 bin tonluk kısmı kurutulularak değerlendirilirken, üretiminin %64.3'ü şaraba, %7.6'sı kurutmalık ve %20.9'u ise sofralık olarak değerlendirilmektedir (Nazlı, 2007).

Dünya üzüm üretimine bakıldığında ülkeler bazında en fazla pay İtalya'ya aittir. Son yıllarda Çin, dünya yaş üzüm üretiminde büyük pay almaya başlamıştır. Dünya'da diğer önemli üzüm üreticisi ülkeler ise Fransa, ABD, İspanya, Türkiye ve İran'dır. 2005 yılında İtalya'nın üzüm üretimi 8.5 milyon tondan daha fazla iken, Türkiye'nin üretimi 3.65 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (Nazlı, 2007).

Türkiye yaklaşık 525 bin hektar bağ alanında, yılda 3.5 milyon ton civarında üzüm üretimi gerçekleştirilmektedir. Üretilen üzümlerin yaklaşık %30'u sofralık, %37'si kurutmalık, %30'u pekmez, pestil, sucuk, şıra ve %3'ü şaraplık olarak değerlendirilmektedir. Türkiye, dünyanın 6. büyük üzüm üreticisidir. Üretilen üzümün yaklaşık %63'ü çekirdekli, %27'si ise çekirdeksiz üzümünden oluşmaktadır. Bölgelerimize göre üretim incelendiğinde ise; Ege Bölgesinde çekirdeksiz kuru üzüm, Marmara Bölgesinde sofralık ve şaraplık, Akdeniz Bölgesinde ilk turfanda, Orta Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde şaraplık, şıralık, sofralık, çekirdekli kurutmalık üzüm yetiştiriciliğinde gelişme görülmektedir (Taşkaya, 2003; Nazlı, 2007).

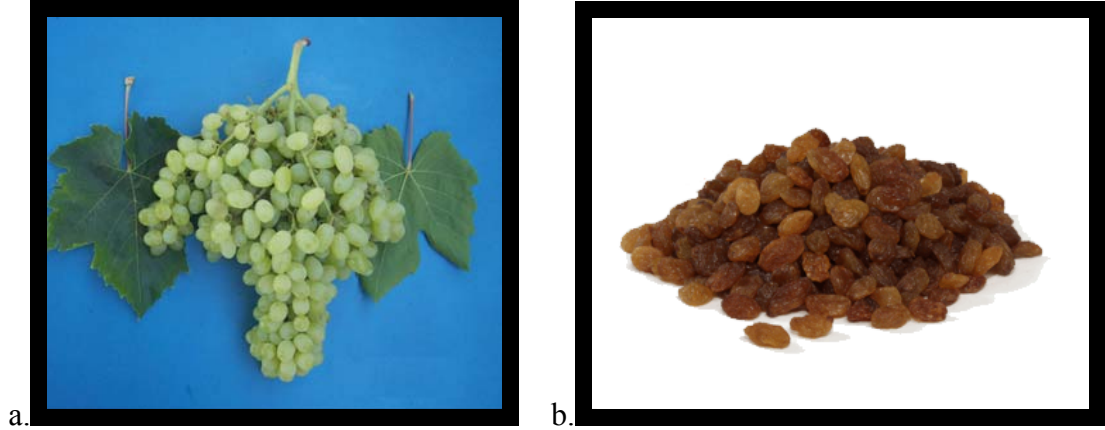
Kuru üzüm ihracatında en önemli pazarlarımız, başta İngiltere olmak üzere sırasıyla, Almanya, Hollanda, İtalya, Avustralya, Fransa, Belçika-Lüksemburg, İspanya ve İrlanda olmak üzere AB ülkeleridir.

Türkiye'nin kuru üzüm ihracatının hemen hemen tamamını çekirdeksiz kuru üzümler oluşturmaktadır. Türkiye'de üretilen kuru üzümün yaklaşık %72-76'sı ihraç edilmekte ve geri kalanı (%24-28) yurt içinde tüketilmektedir. 2004 yılına ait verilere göre Türkiye kuru üzüm üretimi 295.000 ton olarak gerçekleşmiştir (Özden, 2005). Üretimin fazla, ihracatın kısıtlı olduğu yıllarda okul ve askeri kuruluşlarda kuru üzüm tüketim miktarı artırılmıştır. Diğer yandan gelişen sanayi ile birlikte çekirdeksiz kuru üzüm kek, pasta ve şekerleme imalatında kullanılmaktadır. Aynı zamanda 1989 yılından sonra, çekirdeksiz kuru üzüm Tekel tarafından satın alınarak alkollü içki sanayinde kullanılmaktadır (Taşkaya, 2003).

Çekirdeksiz kuru üzüm *Vitis vinifera* L. türüne giren Sultani (Resim 2.1. Sultani üzüm (a. yaş, b. kuru) (Aytekin, 2006)) ve yuvarlak çekirdeksiz üzümlerdir. Sultani kuru üzüm, 18.yy sonlarında yuvarlak çekirdeksiz kuru üzümün ıslah edilmiş çeşididir. Sultani üzümü tane rengi beyaz, uzun oval şekli, orta taneli, ince kabuklu ve tatlıdır. Uzun silindirik şekilli, sık ve iri salkım yapısına sahiptir. (Aytekin, 2006).

Kuru üzümler yaş üzümlerin tekniğine uygun olarak güneşte kurutulmuş, ağartılmış veya ağartılmamış şeklidir. Natürel çekirdeksiz kuru üzüm, hiçbir işlem görmeden veya tabii renk ve yapısını korumak ve çabuk kurumasını sağlamak için, bandırma çözeltisine bandırılarak tekniğine uygun olarak güneşte kurutulmuş üzümdür. Ağartılmış çekirdeksiz kuru üzüm ise kurutulmadan önce veya kurutulduktan sonra kimyasal yollarla ağartılmış kuru üzümdür (Seçer ve İç, 2003).

Bandırma sıvısı olarak potasa denilen potasyum karbonat ile buna zeytinyağı ilave edilmiş şekli bazen de küllü su-zeytinyağı karışımı kullanılmaktadır. Bandırma işlemine tabi tutulan üzümler toprak, kağıt, beton veya tel sergi yerlerinde kurutulmaktadır (Aytekin, 2006).



Resim 2.1. Sultani üzüm (a. yaş, b. kuru) (Aytekin, 2006)

Kaliteli çekirdeksiz kuru üzüm elde edilmesinde; üzümlerin hasadı, kurutulması ve temizlenmesi önem kazanmaktadır. Ayrıca üzümlerin olgunluk durumları içerdikleri şeker miktarının da bir ölçüsü olup kuru üzüm randımanını belirlemede etkili olmaktadır. Üzümler yeterince olgunlaşmadan hasat edilmeleri durumunda tanede yeteri kadar şeker birikmesi gerçekleşmeyeceğinden kuru üzüm randımanı düşük olabilmektedir. Temizleme işlemi ile kalitesiz üzüm tanelerinin yığından ayrılması ile ürün kalitesi iyileştirilmiş olmaktadır. Temizleme işleminin ülkemizde yeterince etkin bir şekilde uygulanmadığının bir göstergesi de, ihrac ettiğimiz kuru üzümlerin ihracı yapılan ülkelerde gıda maddesi olarak kullanılmadan önce genellikle yeniden temizlenmesidir. Buna karşın Yunanistan, son yıllarda üzümlerinin temizlik ve kalitesini artırma yönünde önemli mesafeler almış olup, bu durum Türk kuru üzümlerinin ihracatında engel olarak karşımıza çıkmaktadır. Aynı zamanda ülkemizde kurutma yerleri ürünün kurutulması için elverişli şartlarda bulunmamaktadır. Çoğunlukla yerde veya örtülerin üzerinde kurutulan ürünler toz ve toprakla karışmaktadır (Taşkaya, 2003).

Gıdalarda bulunan ve gelişen küfler, gıdaların kalite ve kantitesini azaltarak önemli ürün kayıplarına neden olurlar. FAO'ya göre, hasat sonrası küflerin neden olduğu ürün kayıp oranı %25'dir. *Botrytis cinerea* (gri küf), *Aspergillus niger* (siyah çürüklük), *Penicillium sp.* (mavi çürüklük) ve *Rhizopus stolonifer* (*Rhizopus* çürüklüğü), bağlarda üzümü olgunlaşma döneminde veya hasat sonrası dönemlerde enfekte ederek meyve kalitesini bozan önemli hasat sonu hastalık etmenleridir. Beş

yıllık bir periyot içinde (1960-1964) Napa vadisi üzümünün %10'unun incelendiği bir araştırmada; üzümün yaklaşık %2'sinin küflerle enfekte olduğu, bu miktarın %90'ında *Botrytis cinerea*, %8'inde *Uncinula necator* (mildiyö) saptanırken, %2'sinde *Aspergillus*, *Cladosporium* ve *Penicillium* cinsi funguslar tespit edilmiştir (Seçer ve İç, 2003).

Hasat sonu hastalık etmenlerinden *Aspergillus* cinsi, depo küfleri arasında sayılmakta olup kuru meyve ve sebzelerde görülen küflenme sorunu içinde önemli bir yer tutmaktadırlar. Uluslar arası ticarete kuru üzümde %0.4 oranında küf miktarına izin verilmesi, bu gruba giren küflerin varlığının dikkatle incelenmesi gerekliliğini zorunlu hale getirmiştir. Çünkü bu grup doğada en fazla rastlanılan mikroorganizmalar cinsinden biri olup, 160'dan fazla türü içermektedir. *A. niger* ise *Aspergillus*'lar içinde en önemli üçüncü grubu oluşturmaktadır. Ülkemizde TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu) tarafından yapılan geniş kapsamlı bir araştırmada; içinde 51 farklı kuru üzüm örneğinin de bulunduğu 156 kuru meyve küf içeriği bakımından incelenmiş ve kuru üzümün %63'ünde *Aspergillus niger* tespit edilmiştir. Aynı örneklerde bu fungus dışında, *Penicillium aurantiogriseum*, *Aspergillus flavus*, *P. expansum*, *P. curvatum*, *A. oryzae*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. rugulosum*, *P. glabrum*, *P. viridicatum*, *A. restrictus*, *A. sulphureus*, *A. sydowii* ve *Epicocum purpurescens* saptanmıştır (Seçer ve İç, 2003).

Eltem ve ark. (2003) Ege Bölgesinde çekirdeksiz üzümde OTA varlığını araştırmak için yaptıkları çalışmada; çeşitli dönemlere ait yaş ve kuru üzüm örneklerinin küf yükleri ve toprak örneklerinde küf izolasyon ve identifikasyonlarını yapmışlardır. Yapılan incelemeler sonucunda bağ topraklarının oldukça yüksek sayıda küf yüküne sahip olduğunu belirlemişlerdir. Yaş ve kuru üzüm örneklerinden *A. aculeatus*, *A. foetidus* var. *pallidus*, *A. foetidus* var. *acidus*, *A. japonicus*, *A. ficuum*, *A. heteromorphus*, *A. tubingensis*, vb. izole ettikleri bu küflerin OTA üreticisi olup olmadıklarına dair yaptıkları çalışmada; İncelenen üzüm örneklerinde en sık rastlanan türlerden ikisi *A. foetidus* var. *Pallidus* ve *A. aculeatus* hakkında literatürde toksin üretimiyle ilgili herhangi bir kayda rastlamadıklarını açıklamışlardır. OTA üretimi açısından inceledikleri iki tür için; *A. aculeatus*'un incelenen 5 suşunun hiç birinde toksin üretimi saptanamamıştır. Buna karşılık *A.*

foetidus var. *pallidus*'un incelenen suşlarının oldukça yüksek toksin üreticileri olduğu saptanmıştır.

Türkiye ve Yunanistan'dan İngiltere'ye ihraç edilen 1997 yılı ürünü 20 çekirdeksiz kuru üzüm örneğinden 17 tanesinde OTA varlığı tespit edilmiştir. Örneklerden 9 tanesinde 0.2–4 ppb, 4 tanesinde 4–10 ppb ve 4 tanesinde ise 10–18.1 ppb arasında OTA saptandığı belirtilmiştir (Karagözlü ve Karapınar, 2000).

2.4. Kuru Üzümde OTA Varlığı İle İlgili Yapılan Çalışmalar

MacDonald ve ark. (1999) kuru üzümde OTA konsantrasyon düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında; 20 kuş üzümü örneğinden 19'unda, 20 sultani üzümünden 17'sinde ve 20 kuru üzümün 17'sinde 0.2-53.6 µg/kg konsantrasyonu arasında OTA tespit edilmiştir. Örneklerdeki OTA ortaya çıkış oranı %88 olarak tespit etmişlerdir.

Osrtly ve ark. (2002) Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) kullanarak yaptıkları çalışmada; Çek marketlerinden topladıkları örneklerde toksijenik küf, toplam küf yükü ve mikobiyal yönden araştırma yapmışlar ve örneklerin %33'ünde 1.8-12.5 µg/kg arasında değişen oranlarda OTA konsantrasyonuna rastlamışlardır.

Stefanaki ve ark. (2003) HPLC kullanarak; 1998 ve 2000 yılları arasında 81 (27 sultani + 54 kuş üzümü) kuru üzüm örneğinde OTA içeriği yönünden araştırmışlar ve çeşit açısından, sultani üzümü örneklerinin (ortalama 0.6 µg/kg) kuş üzümü örneklerinden (ortalama 3 µg/kg) daha az OTA içerdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, OTA seviyesinin yıllara göre farklılık gösterdiğini de belirtmişlerdir. Sultani üzüm çeşidinin 2000 yılı ürünlerinde (ortalama 0.3 µg/kg), kuş üzümünün ise 1999 yılı ürünlerinde (ortalama 0.9 µg/kg) nispeten düşük miktarda OTA tespit etmişlerdir.

Möller ve Nyberg (2003) tarafından, HPLC kullanarak yaptıkları çalışmada; 1999/2000 ve 2001/2002 kış sezonlarında, İsviçre'deki marketlerde yaygın olarak bulunan kuru üzüm ve kuş üzümü markaları OTA içeriği yönünden araştırılmışlardır. Araştırma sonucunda OTA seviyesi, 118 örneğin 94'ünde (oransal olarak %86) 0.1 µg/kg üzerinde bulunurken, 1999-2000 yıllarında yapılan araştırmada bulunan OTA

konsantrasyonları; <0.1-19 µg/kg aralığında bulunmuştur. 2001-2002 sezonu çalışmasında ise; <0.1-34.6 µg/kg aralığında bildirilmiştir.

Eltem ve ark. (2003) tarafından, HPLC kullanılarak yapılan çalışmada; 1998-2001 yıllarında yürütülen araştırmada yaş ve kuru üzüm örnekleri, üzüm yetiştiriciliğinin yaygın olduğu 12 bölgedeki farklı özelliklere sahip bağlardan toplanmıştır. Araştırmacılar Ege bölgesi koşullarının, kuru üzümde OTA oluşumu açısından uygun olduğunu ve özellikle OTA oluşumunun hasat öncesinde tarlada başladığını belirtmişlerdir.

Magnoli ve ark. (2003) tarafından, HPLC kullanarak çekirdeksiz siyah ve beyaz kuru üzümlerde doğal OTA varlığını değerlendirmek ve küf florasını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada, *Aspergillus nigri*'nin OTA üretim kapasitesi araştırılmıştır. Mendoza ve San Juan'dan 50 kuru üzüm örneği (çekirdeksiz farklı çeşitlerde 31 siyah, 19 beyaz) toplanmıştır. Elde ettikleri verilere göre; yüksek miktarlarda bu ürünlerin tüketiminin insanlar için önemli bir OTA kaynağı olabileceğine vurgu yapmışlardır. Araştırmaya aldıkları ürünlerde *Aspergillus section Nigri* kontaminasyonu ve OTA varlığını önemli bulmuşlardır.

1998-2003 yıllar arasında ülkemizde farklı bağlardan elde edilen kuru üzüm örneklerinde OTA içerikleri araştırılmış ve en yüksek değerler 1998 yılında 25.5 µg/kg, 1999 yılında 30 µg/kg ve 2002 yılında 34.84 µg/kg olarak saptanmıştır. (Tosun ve ark., 2006).

Lombaert ve ark. (2004) Sıvı kromatografisi kullanarak yaptıkları çalışmada; 1998-2000 yılları arasında, Kanada'da perakende marketlerden sağladıkları 151 sultani üzüm ve çekirdeksiz kuru üzüm ve 2 kuş üzümü örneğini OTA düzeyi açısından incelemişler ve ölçüm limiti üzerinde OTA konsantrasyonları; çekirdeksiz kuru üzümlerde 85 örneğin 67'sinde (%79), sultani üzümlerde 66 örneğin 39'unda (%59) ve her iki kuş üzümü örneğinde ölçüm limitinin üzerinde bulmuşlardır.

Battilani ve ark. (2004) 1999 ve 2000 yıllarında İtalya'nın kuzey ve güney bölgelerinde yetiştirilen üzümlerde yaptıkları analizler sonucunda *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri izole etmişler. Sıcaklık, yağış ve nem farkının üzümlerde OTA oluşumu üzerinde etkili olduğunu saptamışlar ve üzüm ve ürünleri arasında en

yüksek OTA miktarının kuru üzümde ölçüldüğünü ($40\mu\text{g}/\text{kg}$ 'dan fazla) bildirmişlerdir.

Magnoli ve ark. (2004) tarafından HPLC kullanılarak Arjantin'de marketlerden topladıkları örneklerle yapılan bir çalışmada siyah kuru üzümde ortalama $6.3\mu\text{g}/\text{kg}$, diğer kuru üzüm örneklerinde ise $4.42\mu\text{g}/\text{kg}$ düzeyinde OTA saptanmıştır.

Meyvacı ve ark. (2005) tarafından, HPLC kullanılarak yapılan çalışmada; 1998 ve 2004 yılları arasında her yıl hasat döneminde (1998 - 1999 - 2000) bağlardan ve (2002 - 2003 - 2004) paketlenme-evleri'nden toplanan, toplam 264 işlenmemiş sultani üzümü örneklerinde OTA varlığı araştırılmış ve analiz sonuçlarına göre; %58'inde $0.026-10\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında değişen düzeylerde OTA konsantrasyonu belirlenmiştir.

Akdemir ve ark. (2005) tarafından kuru üzümde yapılan çalışmada; OTA düzeyini $10\mu\text{g}/\text{kg}$ konsantrasyonunun üzerinde olduğunu saptamışlardır.

Romero ve ark. (2005) tarafından Arjantin'de kuru üzümde OTA düzeyi HPLC kullanılarak araştırılmış ve araştırmaya alınan 11 kuru üzüm örneğinden 8'inde $0.11\mu\text{g}/\text{kg}$ ile $0.39\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında değişen konsantrasyonlarda OTA'ya rastlanıldığı ve 3 örnekte tespit edilebilir düzeyde OTA bulunmadığı bildirilmiştir.

Iamanaka ve ark. (2005) tarafından Brezilya'da satışa sunulan kuru üzümde OTA düzeyini tespit etmek amacıyla HPLC kullanılarak yapılan araştırmada; toplam 43 adet kuru üzüm örneğinden 14 tanesinde tespit edilebilir düzeyde OTA bulunamazken ($<0.1\mu\text{g}/\text{kg}$), 21 örnekte $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında, 4 örnekte $5.1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $10.0\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında, 3 örnekte $10.1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $20.0\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 1 örnekte $30\mu\text{g}/\text{kg}$ üzerinde konsantrasyonlarda OTA tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Çağlarırnak (2006) tarafından HPLC kullanılarak; 10 çekirdeksiz kuru üzüm ve 10 sultani üzümde yapılan çalışmada üzümlerin içerdikleri OTA konsantrasyon düzeyleri araştırılmış ve kuru ve sultani tipi üzümde OTA konsantrasyon düzeyleri sırasıyla $1.79-8.92\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında (ortalama: $4.64\mu\text{g}/\text{kg}$) ve $0.48-7.35\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında (ortalama: $2.98\mu\text{g}/\text{kg}$) değişen düzeylerde OTA'ya rastlanmıştır.

Yapılan bazı araştırmalarda kuru üzümde ortaya çıkan OTA konsantrasyon değerlerinin şarap ve üzüm suyuna oranla çok daha yüksek ($50-98\mu\text{g}/\text{kg}$) oranlarda olduğunu bildirmişlerdir. Avrupa'da bazı ülkelerde kuru üzümde OTA düzeylerinin araştırıldığı çalışmalarda ortalama OTA konsantrasyon düzeyinin 2.398

$\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak tespit edildiğine ve Avrupa'nın Kuzey ile Güney bölgelerinde OTA ortaya çıkışları arasında önemli bir fark gözlenmediğine vurgu yapılmıştır. Farklı yıllarda Amerika'da yapılan çalışmalarda 1997 yılında ortalama OTA düzeyi $0.42 \mu\text{g}/\text{kg}$, 1998 ve 1999 yıllarını kapsayan çalışmalarda ortalama $1.27 \mu\text{g}/\text{kg}$ tespit edildiği açıklanmıştır (Varga ve Kozakiewicz, 2006).

Zinedine ve ark. (2007) kuru üzümde OTA varlığını HPLC kullanarak araştırdıkları çalışmalarında, Fas'ın başkenti Rabat'tan topladıkları 20 kuru üzüm örneğinde OTA içeriğini araştırmışlardır. Topladıkları kuru üzümde ortaya çıkan OTA konsantrasyon düzeylerinin $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ ile $4.95 \mu\text{g}/\text{kg}$ arasında değişmekte olduğunu, analize alınan örneklerde ölçüm limiti üzerinde tespit edilen OTA konsantrasyonlarının ortalamasının $0.96 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 0.25$ olduğunu bildirmişlerdir.

Aksoy ve ark. (2007) tarafından HPLC kullanılarak yapılan çalışmada; 1999 ve 2003 yılları arasında toplam 1885 sultani kuru üzüm örneği OTA kontaminasyonu açısından incelenmiş ve 172 örnekte (%9.1) OTA tespit edilememiştir. Geri kalan örneklerde $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ üzerinde değişen konsantrasyonlarda OTA bulunmuştur.

Var ve Yalçındağ (2007) tarafından yapılan çalışmada; Adana'da 22 farklı yerden temin edilen sultani kuru üzüm örneği üzerinde yapılan analiz sonucunda 5.1 ile $18.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ aralığında değişen değerlerde OTA tespit edilmiştir. Araştırmada elde edilen bulgulara göre 22 örnekte 13'ünün (orsal olarak ~ %60) $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ limitinin üzerinde OTA içerdiği; 9 örneğin ise (orsal olarak ~ %40) bu limitin altında değişen oranlarda OTA içerdiği tespit edilmiştir.

Sofralık üzümler için kurutma sonrası renginde kararırma görülen üzümleri OTA varlığının bir göstergesi olarak yorumlamışlar ve kuru üzüm üretiminde hasarlı meyveden kaçınarak, hızlı kurutma ve son temizleme işlemi ve siyah meyveleri uzaklaştırarak son üründe toplam OTA miktarının azaltılabileceğini öngörmüşlerdir (Hocking ve ark., 2007).

2.5. Kuru Üzümde OTA Varlığını Belirlemede Kullanılan Yöntemler

Ürünlerde OTA belirlemede yaygın olarak daha çok floresans detektörlü Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılmaktaysa da, ince tabaka

kromatografisi (TLC) ve immunokimyasal yöntemlerden (ELISA)'de faydalanılmaktadır. Örneğin, Osrtry ve ark. (2002) TLC yöntemini kullanarak kuru üzümde OTA varlığını araştırırken, Var ve Yalçındağ (2007) ELISA yöntemini, Stefanaki ve ark. (2003), Möller ve Nyberg (2003), Eltem ve ark. (2003), Magnoli ve ark. (2003), Magnoli ve ark. (2004), Meyvacı ve ark. (2005), Romero ve ark. (2005), Iamanaka ve ark. (2005), Çağlarırnak (2006), Zinedine ve ark. (2007), Aksoy ve ark. (2007)HPLC yöntemini kullanmışlardır.

3. MATERYAL VE METOT**3.1. Materyal****3.1.1. Kuru Üzüm**

Araştırmada materyal olarak İzmir yöresinden getirilip Adana’da market ve pazar yerlerinde satışa sunulan 3’ü ambalajlı ve 37’si açıkta tüketime sunulan toplam 40 adet sultani kuru üzüm örneği kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Fosfat tamponu (PBS) hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler Merck (Darmstadt, Almanya) marka kullanılmıştır.

Kuru üzüm örneklerinde OTA varlığının yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle belirlenmesinde HPLC saflığında, Merck (Darmstadt, Almanya) marka kimyasallar kullanılmıştır. Araştırmanın tüm analitik aşamalarında Millipore Synergy 18S (Millipore, Fransa) cihazı tarafından üretilen ultra saf su kullanılmıştır. Örnekler HPLC cihazına enjeksiyondan önce, 0.45 µm gözenek çaplı steril membran filtrelerden (Schleicher & Schuell “Dassel, Almanya” firmasına ait) geçirilmiştir.

3.1.3. Okratoksin A Standardı

Araştırmada *Aspergillus ochraceus* tarafından ticari olarak üretilmiş olan (Sigma-Aldrich, USA) OTA standardı kullanılmıştır. OTA, 1 mg olarak kristal formda temin edilmiş olup, analize alınıncaya kadar buzdolabı koşullarında (+4°C) muhafaza edilmiştir.

3.1.4. OTA Immunoaffinity Kolonu

Gıda materyali olarak kullanılan kuru üzümlerden OTA ekstraksiyonu amacıyla OCHRAPREP (P14B, İskoçya) immunoaffinity kolon kullanılmıştır.

3.2. Metot

Toplam 40 adet kuru üzüm örneğinden immunoaffinity kolon kullanılarak ekstrakte edilen Okratoksin A, Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı ile kantitatif olarak araştırılmıştır.

3.2.1. OTA Standart Çözeltinin Hazırlanması

Kristal formda 1 mg olarak satın alınan OTA çözeltisi (amber renkli şişe içerisinde) 2 ml benzen/asetik asit (99:1, vol:vol) ile çözündürülmüştür. Çözelti bir gece oda koşullarında bekletilerek kristal formun tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Bu şekilde 500 µg/ml (500 ppm) konsantrasyonunda OTA stok standart çözeltisi hazırlanmış ve -18°C'de muhafaza edilmiştir. OTA çalışma çözeltisinin hazırlanması amacıyla stok çözeltiden 50 µl alınarak 25 ml'lik amber renkli balon jøjeye aktarılmış ve 1 µg/ml (1000 ppb) elde etmek amacıyla benzen/asetik asit (99:1, vol:vol) ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. OTA çalışma standardı -18°C'de muhafaza edilmiştir. OTA çalışma standart çözeltisi kullanılmadan önce, sıcaklığının oda koşullarına gelmesi beklenmiştir.

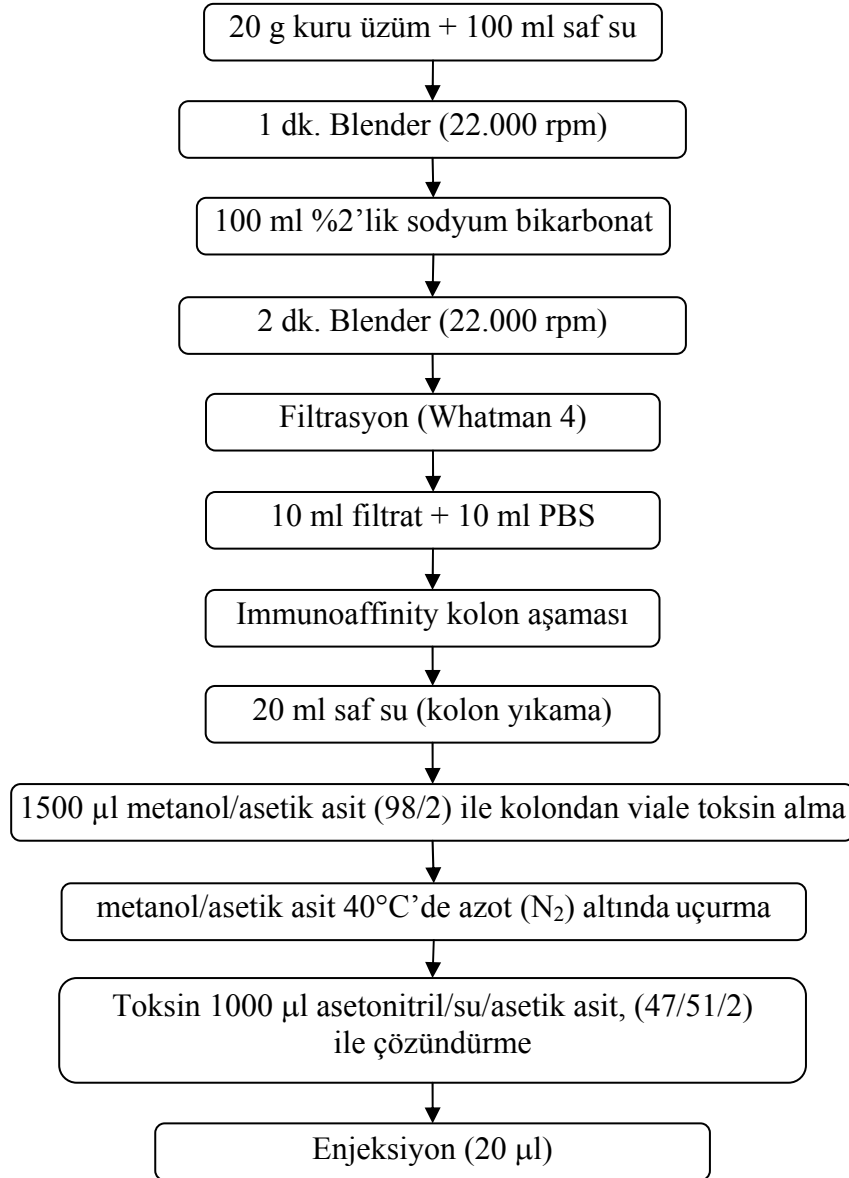
3.2.2. Kuru Üzümlerde OTA Varlığının Araştırılması

Piyasadan temin edilen kuru üzüm örnekleri (500 g) ekstraksiyonları yapılabilmek için buzdolabı koşullarında (+4°C) muhafaza edilmiştir.

20 g kuru üzüm örneği üzerine 100 ml saf su eklenerek Waring blenderda (Waring Commercial Laboratory Blender - Waring Products Division USA) 1 dakika

(dk.) yüksek devirde (22.000 rpm) karıştırılmıştır. Daha sonra 100 ml %2 lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃) çözeltisi blenderdeki karışım üzerine eklenip 2 dk. yüksek devirde (22.000 rpm) karıştırılıp, homojenize edildikten sonra 4 numaralı Whatman filtre kâğıdından süzölmüştür. 10 ml filtrat ile 10 ml PBS karıştırılarak OTA'ya karşı spesifik antikorlar içeren immunoaffinity kolondan dakikada 2-3 ml hızla geçirilmiştir. Daha sonra immunoaffinity kolon 20 ml ultra saf su kullanılarak yıkanmış ve kolon kurutulmuştur. Spesifik antikorlara bağılı halde bulunan OTA kolondan 1500 µl metanol/asetik asit (98/2) kullanılarak 10 ml lik viallere alınmıştır. Bundan sonraki aşamada metanol/asetik asit karışımının ortamdan uzaklaştırılması için vialler 40°C'de N₂ gazı altında uçurulmuş ve kalıntı 1000 µl hareketli faz (asetonitril/su/asetik asit, 47/51/2) ile çözöndürölmüştür. 20 µl örnek, floresans detektörlü HPLC cihazına enjekte edilerek, kuru üzüm örneklerinde OTA varlığı ve/veya miktarı tespit edilmiştir. Çizelge 3.1.'de Kuru üzüm örneklerinin ekstraksiyon aşaması gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kuru üzüm örneklerinin ekstraksiyon aşaması



3.2.3. OTA Analizi

Kuru üzüm örneklerinde OTA varlığının araştırılmasında bölümümüz Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bulunan floresans detektörlü Agilent 1100 model (USA) HPLC cihazı kullanılmıştır. OTA analizi için uygulanacak metot gerekli

literatür araştırmalarından (Rhone Diagnostics 1999, Meyvacı ve ark. 2005, Çağlarırnak 2006, Aksoy ve ark. 2007) sonra aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur.

Kolon: C18 (250x4.6 mm, 5 µm, Advanced Chromatography Technologies, İskoçya)

Hareketli faz: Asetonitril/su/ asetik asit (47/51/2, vol/vol/vol)

Hareketli faz akış hızı: 1 ml dak⁻¹

Basınç: Minimum 0 bar, maksimum 200 bar

Analiz süresi: 15 dakika

Alıkonma zamanı: 12.4-13.2 dakika

Enjeksiyon miktarı: 20 µl

Excitation (tahrik dalga boyu): 333 nm

Emission (yayım dalga boyu): 470 nm

HPLC cihazında okutulan örneklerin OTA konsantrasyon düzeylerini tespit etmek amacıyla değişik konsantrasyonlarda hazırlanan OTA standart çözeltileri HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Kalibrasyonda 0.3, 0.5, 1, 2, 5, 10 ppb olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda OTA standart çözeltisi kullanılmıştır.

HPLC cihazına enjekte edilen standartlarına karşılık gelen pik alanlarına göre cihazda bulunan yazılım “Chemstation software (Agilent) paket programı” kullanılarak 6 farklı noktadan kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ($r^2=0.998$). Kuru üzüm örneklerinde OTA varlığının araştırılmasında hazırlanan bu kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır.

3.2.4. Geri Kazanım, Tespit ve Ölçüm Limiti Çalışmaları

Analize alınarak OTA açasından sorunsuz olduğu gösterilen kuru üzüm örneğinde tespit limiti ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Tespit limiti çalışması için OTA açasından sorunsuz numune üzerine Okratoksin A miktarları 0.1, 0.2, 5 ve 10 ppb olacak şekilde toksin eklenerek geri alma çalışmaları yapılmıştır. Tespit ve ölçüm limitlerinin belirlenmesi sinyal-gürültü oranı baz alınmış olup, sinyal/gürültü oranının 3 katı tespit limiti, 10 katı ise ölçüm limiti olarak çalışılmıştır (MacDonald ve ark. 1999, Rhone Diagnostics 1999, Möller ve Nyberg 2003, Lombaert ve ark. 2004).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Araştırma kapsamında 40 kuru üzüm örneği OTA varlığı ve düzeyleri açısından araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar AB ülkelerinde ve Türk Gıda Kodeksi (TGK)'nde kabul edilen maksimum OTA limitlerine göre değerlendirilmiştir.

4.1. Geri Kazanım, Tespit ve Ölçüm Limiti Çalışmaları

Kuru üzüm örneklerinde OTA varlığının araştırılmasında bölümümüz Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bulunan floresans detektörlü Agilent 1100 model (USA) HPLC cihazı kullanılmıştır (Resim 4.1.).

Analize alınarak OTA açısından sorunsuz olduğu gösterilen kuru üzüm örneğinde tespit limiti ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Tespit limiti çalışması için OTA açısından sorunsuz numune üzerine OTA miktarları 0.1, 0.2, 5 ve 10 ppb olacak şekilde toksin eklenerek geri alma çalışmaları yapılmıştır. Materyal olarak kullanılan kuru üzüm örneğine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Geri kazanım çalışmalarının sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

% Geri Kazanım aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{a}{b} * 100$$

a = Cihazda okunan OTA konsantrasyonu değeri

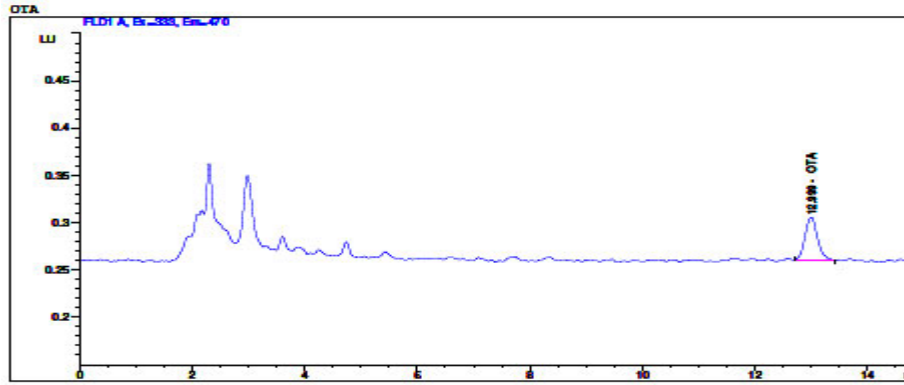
b = Numuneye ilave edilen OTA konsantrasyonu

Türk Gıda Kodeksi, gıda maddelerinde mikotoksinlerin seviyesinin resmi kontrolü için numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri tebliğinde yer alan OTA için performans kriterlerinde kabul edilebilir geri kazanım değerleri; 1 µg/kg'dan az konsantrasyonlar için %50-%120 ve 1-10 µg/kg aralığındaki konsantrasyonlar için %70-%110 olarak belirtilmiştir (Anonymous, 2007). Araştırmamızda elde ettiğimiz geri kazanım çalışmalarının sonuçları Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen değerlere uygun bulunmuştur.

Tespit ve ölçüm limitlerinin belirlenmesinde sinyal/gürültü oranı baz alınarak elde edilen sonuçlara göre, 0.1 ppb tespit limiti, 0.3 ppb ölçüm limiti olarak belirlenmiştir.



Resim 4.1. OTA analizlerinde kullanılan HPLC cihazı (Agilent 1100).



Şekil 4.1. Kuru üzüm örneğine ait HPLC kromatogramı

Çizelge 4.1 OTA Açısından temiz kuru üzümde % geri kazanım çalışması

Toplam OTA Miktarı ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Saptanabilen OTA Değerleri ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	% Geri Kazanım
0.1 ppb	0	0
0.2 ppb	0.142	71
5 ppb	4.222	84
10 ppb	8.213	82
Ortalama		79

4.2. Kuru Üzümlerde OTA Varlığı

Piyasadan, farklı yerlerden temin edilen kuru üzüm örneklerinin ekstraksiyonu yapılarak, üzümlerde OTA varlığı araştırılmıştır. Toplam 40 farklı örneğe ait üzümlerin OTA içerikleri ve miktarları ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2.'den de görüleceği gibi piyasadan temin edilen sultani çeşit 40 adet kuru üzüm örneğinin 26'sında 0.38 ile 20.90 µg/kg (ppb) aralığında değişen konsantrasyonlarda OTA tespit edilmiştir. 14 örnekte tespit edilebilir düzeyde OTA'ya rastlanmamıştır. Türk Gıda Kodeksi'nde ve Avrupa Birliği tarafından kuru üzümde kabul edilebilir maksimum OTA miktarı 10 µg/kg olarak bildirilmektedir (Anonymous, 2002; Anonymous, 2006b). Örneklerimizin 23'ünde 10 µg/kg'ın altında 0.38-7.65 µg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda OTA saptanmıştır. 3 kuru üzüm örneğinde ise OTA miktarı maksimum limit olarak verilen 10 µg/kg konsantrasyonun üzerinde, 11.34, 19.39, 20.9 µg/kg olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Kuru üzüm örneklerindeki OTA düzeyleri

ÖRNEK NO	OTA DÜZEYİ (µg/kg)	ÖRNEK NO	OTA DÜZEYİ (µg/kg)	ÖRNEK NO	OTA DÜZEYİ (µg/kg)
1	TEDB	15	0.39	29	0.39
2	1.64	16	TEDB	30	TEDB
3	TEDB	17	7.65	31	20.90*
4	11.34*	18	0.41	32	TEDB
5	1.55	19	TEDB	33	0.38
6	19.39*	20	0.40	34	0.61
7	TEDB	21	TEDB	35	0.48
8	1.04	22	1.20	36	2.04
9	0.50	23	TEDB	37	TEDB
10	TEDB	24	4.18	38	0.43
11	0.58	25	TEDB	39	2.36
12	TEDB	26	2.13	40	4.98
13	2.14	27	TEDB		
14	1.11	28	0.98		

TEDB: Tespit Edilebilir Düzeyde Bulunamadı

*. Türk Gıda Kodeksi'nde ve Avrupa Birliği'nde kabul edilebilir maksimum OTA limitinin üzerinde olan örnekler

Araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre kuru üzüm örneklerindeki ortalama OTA ($2.23 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 4.73$) konsantrasyon düzeyinin yasal limitin ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) altında olduğu görülmüştür.

Daha çok İzmir ve çevresinde yetiştirilen sultani üzümler Türkiye'nin değişik bölgelerinde satışa sunulmaktadır. Kuru üzümler üzerine yapılan çalışmalar daha çok yetiştirildiği bölgelerimizde yoğunlaşmıştır. Depolama, taşıma ve satış noktalarındaki uygunsuz koşullar üründe küf üremesine ve toksin oluşumuna neden olabilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız sultani kuru üzüm örnekleri İzmir ve çevresinden getirilen ve bölgemizde satışa sunulan üzümler olup yaptığımız çalışma ile kuru üzümlerin yetiştirildikleri bölgelerde yapılan çalışmalar ile bölgemizde satışa sunulan kuru üzümleri OTA içeriği açısından karşılaştırma imkânı sağlamış olmaktadır.

Bölgemizde tüketime sunulan kuru üzümlerde OTA içeriği ilgili daha önce Var ve Yalçındağ (2007) tarafından ELISA yöntemi kullanarak yapılan araştırmada, Adana'da 22 farklı yerden temin edilen sultani kuru üzüm örnekleri kullanılmış ve 5.1 ile $18.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ aralığında değişen değerlerde OTA tespit edilmiştir.

1998-2003 yılları arasında ülkemizde farklı bağlardan elde edilen kuru üzüm örneklerinde OTA içerikleri araştırılmış ve üzüm örneklerinde ortalama OTA düzeyinin $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 'den daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Tosun ve ark., 2006).

Meyvacı ve ark. (2005) tarafından 1998-2004 yıllarını kapsayan çalışmalarında sultan üzümlerindeki OTA içeriğinin yıllara göre gösterdiği farklılığı önemli bulmuşlar ve farklılığın nedenlerinden biri olarak yıllara göre iklim koşullarındaki farklılık ile ilişkilendirmişleridir.

Çağlarırnak (2006) tarafından çekirdeksiz kuru üzümleri ve sultani üzümlerini OTA içeriği yönünden araştırmışlar ve elde ettikleri bulgulara göre yasal limit üzerinde OTA konsantrasyonuna rastlamamışlardır. Araştırma sonucunda özellikle güneşte kurutma yöntemi yerine mekanik kurutma yönteminin tercih edilmesi durumunda ürünlerdeki OTA miktarının daha da azaltılabileceğini açıklamışlardır.

Aksoy ve ark. (2007) çalışmada; 1999 ve 2003 yılları arasında toplam 1885 sultani üzüm örneği OTA konstaminasyonu açısından incelemiş ve yıllara göre OTA miktarında farklılığı önemli bulmuşlardır. Ayrıca ürünlerdeki OTA miktarını en aza

indirebilmek amacıyla tüm üretim zincirini hedef alan stratejiler geliştirilmesi gerektiğini ve özellikle ürünün işlenmesi aşamasında hasarlı tanelerin ayrılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Yurt dışında yapılan çalışmalarda ise; Stefanaki ve ark. (2003) 1998 ve 2000 yılları arasında sultani üzüm ve kuş üzümünde OTA içeriğini araştırmışlar ve çeşit açısından, sultani üzümü örneklerinin kuş üzümü örneklerinden daha az OTA içerdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar teknolojiye yararlanılarak gıdalardaki OTA miktarının mümkün olan en aza indirilmesine, OTA üzerinde sistematik araştırmaların yapılmasına ve iyi tarım uygulamalarına dikkat çekmişlerdir.

Möller ve Nyberg (2003) 1999/2000 ve 2001/2002 kış sezonlarında, İsviçre'deki marketlerde yaygın olarak bulunan çeşitli firmalara ait kuru üzüm ve kuş üzümü örneklerini OTA içeriği yönünden araştırmışlardır. Araştırma sonucunda 1998/2000 sezonlarına ait ürünlerdeki OTA miktarının 2001/2002 sezonları ürünlerine kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda çıktığını açıklamışlardır.

Magnoli ve ark. (2003) Mendoza ve San Juan'dan sağladıkları 50 kuru üzüm örneğini (çekirdeksiz farklı çeşitlerde 31 siyah, 19 beyaz) OTA içeriği açısından araştırmışlardır. Elde ettikleri verilere göre; yüksek miktarlarda bu ürünlerin tüketiminin insanlar için önemli bir OTA riski olabileceğine vurgu yapmışlardır.

Lombaert ve ark. (2004) Kanada'da 1998-2000 yılları arasında kapsayan sultani üzüm, çekirdeksiz kuru üzüm ve kuş üzümü örneklerini OTA düzeyi açısından incelemişler ve araştırma sonuçlarının diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bunun nedeni olarak, dünya pazarında sınırlı sayıda üzüm ihracatçısı ülke bulunduğunu ve bu ihracat ürünlerinin sorunlu olması durumunda tüm pazarın etkilenebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca OTA'nın ürün içinde heterojen olarak bulunduğunu ve yığılı temsil eden örnekleme yöntemlerinin önemine işaret etmişlerdir.

Battilani ve ark. (2004) 1999 ve 2000 yıllarında İtalya'nın kuzey ve güney bölgelerinde yetiştirilen üzümlerde yaptıkları analizler sonucunda sıcaklık, yağış ve nem farkının üzümlerde OTA oluşumu üzerinde etkili olduğunu saptamışlardır.

Magnoli ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada üzümde OTA konsantrasyonunu dikkate değer bulmuşlar ve tüketici sağlığını korumaya yönelik daha fazla çalışmanın yapılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Romero ve ark. (2005) tarafından Arjantin'de kuru üzümde OTA düzeyi araştırılmış ve diğer çalışmalarla kıyaslandığında daha düşük OTA konsantrasyonu bulmuşlardır. Bunun nedeni olarak da toksin üreten küflerin dağılımındaki farklılık, coğrafi orijin, klima ve kurutma yöntemleri gibi bir çok faktörün toksin üretimini etkilemesi olarak açıklamışlardır.

Iamanaka ve ark. (2005) Brezilya'da satışa sunulan kuru üzümde OTA düzeyini tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada; kuru üzümde ortaya çıkan OTA'nın ara sıra ortaya çıkan bir vaka olmayıp, yapılan çalışmalarla süreklilik gösterdiği ve daha fazla araştırma yapılarak OTA koşulları ile ilgili ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiğini açıklamışlardır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Üzüm, kuru üzüm ve diğer üzüm içerikli ürünlerde OTA varlığı ülkemizin de içinde bulunduğu üzüm yetiştiriciliğinin yaygın olduğu ülkelerde önemli bir sorun haline gelmiştir. Üzümler, hasat öncesi, hasat sırasında veya üzümlerin işlenmesi aşamasında çeşitli küf türleri tarafından kontamine olabilmektedir. Üzümlerin özellikle *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Uncinula* ve *Plasmopara* cinsi küfler tarafından saldırıya uğradığı belirtilse de, *Aspergillus carbonarius*, üzümlerde OTA oluşumuna neden olan en önemli küf türü olarak bilinmektedir. Diğer mikotoksijenik küflerde olduğu gibi okratoksijenik küf gelişimi ve OTA oluşumu, ürünün gelişimi, hasat, kurutma ve depolama aşamalarındaki nem ve sıcaklık koşullarına bağlı olarak gerçekleşmektedir.

Mısır, arpa, buğday, buğday kepeği, kepekli buğday unu, pirinç, şarap, bira, kavrulmuş kahve, kakao çekirdekleri ve baharatlar OTA açısından riskli gıda maddeleri olarak görülmektedir. Ürünlerde OTA varlığını araştırmak için resmi olarak yayınlanmış çeşitli metotlar bulunmaktadır. Yayınlanan metotlarda temelde floresans dedektörlü sıvı kromatografisi önerilmekte olup, ekstraksiyon aşamasında da katı-faz ekstraksiyon temizleme veya immunoaffinity kolon yaygın olarak kullanılmaktadır. Yayınlanan metotların tespit limitlerinin düşük olması (<0.5 µg/kg) ve bir çok gıda ürününe başarı ile uygulanabilmesi önemli avantajlar sunmaktadır.

Ülkemizde geçmiş yıllarda kuru üzümlerde OTA varlığı ile ilgili önemli sorunlar yaşanmıştır. Daha önce yapılan birçok çalışmada kuru üzümlerde farklı düzeylerde OTA varlığına rastlanmıştır. Bölgemizden temin edilen kuru üzümlerde OTA varlığının araştırıldığı çalışmamızda; 40 kuru üzüm örneği üzerinde yapılan analiz sonucunda 0.38 ile 20.90 µg/kg aralığında değişen konsantrasyonlarda OTA tespit edilmiştir. Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular 3 adet kuru üzüm örneğinde (11.34, 19.39, 20.9 µg/kg) maksimum limit olarak belirlenen 10 µg/kg konsantrasyon değerinin aşıldığını göstermektedir. Geri kalan 37 örneğin 14'ünde tespit edilebilir düzeyde OTA'ya rastlanmazken, 23 örnekte 0.38–7.65 µg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda OTA'ya rastlanmıştır.

Tarımsal ürünlerde mikotoksin oluşumu, ürüne bağlı olmak üzere, ürünün yetiştirme sürecinden tüketime kadar, küf üremesi için uygun olan koşullarda, her aşamada meydana gelebilmektedir. Bu nedenle mikotoksinler, gıda güvenliğinin sağlanması açısından kontrol altına alınması gereken önemli sorunlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Mikotoksinlerin gerek sağlık, gerekse ekonomik yönden yarattığı sorunlar araştırmacıları mikotoksin oluşumunun engellenmesi ve/veya mikotoksinlerin ortamdaki uzaklaştırılmasına yönelik kontrol stratejilerine yöneltmiştir. Gıda ve yem maddelerinde, mikotoksin oluşumunun ve sağlık üzerine olumsuz etkisinin önlenmesi için; mikotoksin oluşumunun engellenmesi, gıda ve yem maddelerinde mikotoksinlerin detoksifikasyonu ve sindirim sisteminde mikotoksin absorpsiyonunun engellenmesi gibi yöntemler önerilmektedir.

Ürünlerde mikotoksinler bir kez ortaya çıktıktan sonra ürünlerden uzaklaştırılması ya mümkün olamamakta ya da yapılan uygulamalar gıda güvenliği açısından yetersiz kalmaktadır. Günümüzde ürünlerden mikotoksinlerin detoksifikasyonuna yönelik bir takım yöntemler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır ve henüz etkin bir şekilde uygulanabilen yöntem geliştirilememiştir.

Bu nedenle, günümüzde ürünlerde mikotoksin oluşumunun engellenmesine yönelik; hasat öncesi uygulamalar, hasat sırasındaki uygulamalar ve hasat sonrası uygulamalar olarak ele alınan bu stratejiler daha da önem kazanmaktadır. Tarım ürünlerinde mikotoksinlerin küfler tarafından üretildiği, küflerin ise yoğun bir şekilde toprakta buldukları bilinen bir gerçektir.

Üzüm ve ürünlerinde OTA oluşturan küflerin ana kaynağı toprak olarak bildirilmektedir. Üzümlerde OTA oluşumunun engellenmesi için öncelikle topraktaki küflerin üzüme bulaşmasını engelleyecek tedbirlerin alınması önerilmektedir. Bu amaçla, ben düşme döneminden sonra sulamanın azaltılması ve toprak işçiliğinden kaçınılması ve tercihen damla sulama yöntemi kullanılması küf üremesini azaltabilecektir. Aşırı hormon kullanımı sonucu tanelerde kabuğun çatlaması, hastalık veya mekanik nedenlerle zedelenmesi küflerin çoğalabileceği ortam oluşturabilmektedir. Bu nedenle, hormon kullanımında aşırılıktan sakınılması, bitki koruma önlemlerinin dikkatle yerine getirilmesi gerekmektedir. Üretimin her

aşamasında, küflü, balgamlı, çürük, kurtlu ve hasarlı tanelerin ayrılması, sergi alanlarında sağlam tanelerle beraber kurutulmaması yine alınabilecek önlemler arasındadır.

Bu önlemlerle beraber, üzüm ve ürünlerinde OTA oluşumunun engellenmesi amacıyla uygulamaya konulması gereken iyi tarım uygulamalarına yönelik yapılan öneriler şu şekilde özetlenebilir: Üzüm ve toprak çeşidine uygun anaç seçimi yapılması, sıra üzeri ve sıra arası mesafelerin doğru ayarlanması ve doğru terbiye sisteminin uygulanması gerekmektedir. Asmalarda ürün yükü iyi ayarlanarak aşırı yükten kaçınılması ve budama terbiye sistemlerine uygun şekilde yapılması da öneriler arasındadır. Bir başka öneri ise, olgunlaşma döneminde toz oluşturan toprak işçiliğinden kaçınılarak toprakta mevcut olan küflerin tozla taşınıp meyvelere ulaşma riskinin azaltılmasıdır. Toprak yüzeyini az ıslatan dar kanallı karık sulama sistemlerinin tercih edilmesi, mümkünse damla sulama sistemi kullanılması ve aşırı sulama ve geç dönem sulamalardan kaçınılması yine dikkat edilmesi gereken noktalar olarak vurgulanmaktadır. Kurutmalık üzümler ile ilgili öneriler arasında, sulamanın hasattan en geç bir ay önce kesilmesi, çürük ve küflü salkımların hasat sırasında sağlam salkımlardan ayrılması, sorunlu salkımların hiçbir şekilde kurutulmaması ve başka ürünler için kullanılmaması bulunmaktadır. Sergide ise, salkım inceltme işleminin tanelere zarar vermeyecek şekilde uygulanması, üzümlerin sergide tam kurutulmadan kaldırılmaması (%12–13 nem), üzümler sergiden kaldırıldıktan sonra mutlaka savurma makinesinde savrulması, boş ve sağlıksız tanelerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Üzümlerin depolanması için plastik kasa veya küçük çuvallar kullanılması ve çuval ağırlığının 50 kg aşmaması, nihai ürünü korumak açısından önem taşımaktadır. Bu kasa ve çuvalların depo zemini ve duvar ile temas etmemesi ve depo sıcaklığının 5–10°C sıcaklık aralığında ve nispi nemin de %65 olması önerilmektedir.

Alınan bütün bu önlemlere rağmen ürünlerde OTA sorunu karşımıza çıkabilmektedir Özellikle OTA içeriği yönünden risk gurubu içerisinde yer alan ürünlerin kontrollerinin rutin olarak yapılması ve sorunlu ürünlerde limitlerin üzerinde OTA içermesi durumunda HACCP sisteminin bir gereği olarak imhası yoluna gidilmelidir. Ayrıca kuru üzümlerde daha önceki yıllarda ortaya çıkan OTA

sorunu sonrasında, ihracata yönelik olarak ya OTA yönünden sorunsuz ürünler seçilmekte ya da OTA riski taşıyan ürünlerin iç piyasaya sürülmesi söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle, ihracata yönelik ürünlerde sıkı kontrollerin uygulanmasının yanı sıra iç pazara yönelik de sıkı kontrollerin uygulamaya konulması gerekmektedir. Beslenme açısından önemli bir ürün olan kuru üzüm çeşitli ürünlere (komposto, unlu mamüller, kuru üzüm suyu, pasta vb.) işlenerek tüketimi söz konusudur. OTA bir çok gıda işleme yöntemlerine karşı kararlı bir bileşik olarak karşımıza çıkmaktadır. Üzüm ve ürünlerinin geniş bir tüketici popülasyonu söz konusu olup sorunlu ürünlerin özellikle öncelikli risk grupları içerisinde yer alan immun sistemi daha zayıf olan çocuk ve yaşlılar tarafından da tüketimi, ortaya çıkabilecek sağlık sorunlarını daha da ön plana çıkarmaktadır.

Türk tarım ürünlerine OTA üreten küflerin bulaşmasını engellemek ve OTA sorunu yaşamamak için üniversiteler, üzüm yetiştiricileri ve diğer ilgili kurumlar işbirliği yapmalı, alınması gereken önlemler ve uygulama olanakları araştırılmalı, iyi tarım uygulamaları (GAP) ve HACCP uygulamaları entegre şekilde kullanılmalıdır. Ayrıca ülkemizde başka hangi gıdaların OTA açısından risk taşıdığı, geniş saha çalışmaları ile risk tayini yapılarak saptanmalı ve elde edilen bulgular ile sorun çözülmeye çalışılmalıdır.

KAYNAKLAR

- ABARCA, L. M., ACCENSI, F., BRAGULAT, M. R., and CABANES, F.J., 2001. Current Importance of Ochratoxin A-Producing *Aspergillus spp.* Journal of Food Protection, 64(6):903-906.
- AKDEMİR, Ç., ÖZKAYA, Ş., BAŞARAN, A., AKŞAHİN, I., KAYMAK, T., TOPUZ, F., ERGÜL, M., ATAK, M., ve ZABE, N., 2005. Çekirdeksiz Kuru Üzüm Numunelerinde Okratoksin A Analiz Yöntemi Geliştirilmesi ve Yöntemin Validasyon Çalışması (HEPERKAN, D., GÜLER, F. K., KAYA, G. D. Editör). 2. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Bildiriler Kitabı, 23-24 Mayıs, İstanbul, 109-115
- AKSOY, U., SABIR, E., ELTEM, R., KIRAÇ, S., SARIGÜL, N., MEYVECİ, B. K., ve ATEŞ, M., 2003. Kuru İncirlerde Okratoksin A'nın Potansiyel Kontaminasyon Riskinin Araştırılması (HEPERKAN, D., DALKILIÇ, G., ŞENYUVA, H. Editör). I. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül, İstanbul, 41- 47.
- AKSOY, U., ELTEM, R., MEYVACI, K.B., ALTINDISLI, A., and KARABAT, S., 2007. Five-Year Survey of Ochratoxin A in Processed Sultanas From Turkey. Food Additives and Contaminants, March 2007, 24(3):292–296.
- ALTINDIŞLI, A., 2003. Kuru Üzüm Üretiminde OTA'nın Engellenmesine Yönelik İyi Tarım Uygulamaları (ELTEM, R., AKSOY, U., MEYVACI, K. B. Editör). Mikotoksinler Biyoteknolojisi; Sorunlar ve Çözümler Çalıştayı, 17-20 Haziran, İzmir, 85-91.
- ANLI, E., ÇABUK, B., VURAL, N., and BAŞPINAR, E., 2005. Ochratoxin A in Turkish Wines. Journal of Food Biochemistry, Blackwell Publishing 29:611-623.
- ANONYMOUS, 1995. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO Technical Report Series, 859).

- ANONYMOUS, 2002. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 23.09.2002-24885 nolu Resmi Gazete.
- ANONYMOUS, 2006a. Funguslar ve Mikotoksinler. Online: <http://www.mikrobiyoloji.org>
- ANONYMOUS, 2006b. Maksimum Limits for Ochratoxin A, European Commission. Online: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/ochratoxin_en.htm
- ANONYMOUS, 2006c. Risk Assessment Studies Report No. 23: Ochratoxin A in Food. Centre for Food Safety, Food and Environmental Hygiene Department, The Government of the Hong Kong Special Administrative Region.
- ANONYMOUS, 2007. Gıda Maddelerinde Mikotoksinlerin Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama Ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 26.04.2007-26504 nolu Resmi Gazete.
- AYTEKİN, M., 2006. Yenicekent Kasabasında Bağcılık. Buldan Sempozyumu Bildirileri Kitabı, 989-998.
- BATTILANI, P., and PIETRI, A., 2002. Ochratoxin A in Grapes and Wine. European Journal of Plant Pathology, 1008: 639-643.
- BATTILANI, P., PIETRI, A., and LOGRIECO, A., 2004. Risk Assesment and Management in Practice: Ochratoxin in Grapes and Wine. Mycotoxins in Food: Dedection and Control, :244-261.
- BOZOĞLU, F., 2003. Mikotoksinlerin Oluşum Mekanizması (Heperkan, D., Dalkılıç, G., Şenyuva, H. Editör).Ulusal Mikotoksin Kongresi, Sempozyumu, 18-19 Eylül, İstanbul, 17-22.
- CABANES, F. J., ACCENSI, F., BRAGULAT, M. R., and ABARCA, M. L., 2002. What Is The Source of Ochratoxin A in Wine. International Journal of Food Microbiology, 79:213-215.

- CALVO, A. M., 2005. Mycotoxins (edited by W. M. Dąbrowski and Z. E. Sikorski edited). Toxins In Food, CRC Press LLC, Chapter 5.
- CREPPY, E. E., 2002. Review Article: Update of Survey, Regulation and Toxic Effects of Mycotoxins in Europe. Toxicology Letters, 127:19-28.
- ÇAĞLARIRMAK, N., 2006. Ochratoxin A, Hydroxymethylfurfural and Vitamin C Levels of Sun-Dried Grapes and Sultanas. Journal of Food Processing and Preservation, 30:549–562.
- DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., ve MONTVILLE, T.J., 1997. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, ASM Press, Washington D.C.
- ELTEM, R., AKSOY, U., ALTINDİŞLİ, A., SARIGÜL, N., TAŞKIN, E., AŞKUN, T., ATEŞ, M., MEYVACI, B., ARASILER, Z., TURGUT, H., ve KARTAL, N., 2003. Ege Bölgesinde Çekirdeksiz Kuru Üzümlerde OTA Oluşumunun Belirlenmesi (HEPERKAN, D., DALKILIÇ, G., ŞENYUVA, H. Editör). I. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül, İstanbul, 54-59.
- GOLOB, P., 2007. Good Practices For Animal Feed And Livestock 1: Training Manual. In On-Farm Mycotoxin Control In Food And Feed Grain. Food And Agriculture Organization Of The United Nations Rome, 1-10.
- GÜMÜŞ, T., ARICI, M., ve DEMİRCİ, M., 2003. I. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu 18-19 Eylül, İstanbul, 190.
- GÜRSES, M., ve ERDOĞAN, A., 2003. Önemli Bazı Mikotoksinler ve Gıdalarda Bulunmasına İzin Verilen Maksimum Düzeyleri (HEPERKAN, D., DALKILIÇ, G., ŞENYUVA, H. Editör.) . Ulusal Mikotoksin Kongresi, 18-19 Eylül, İstanbul, 197.
- HEPERKAN, D. 2003. Gıdalarda Mikotoksinler ve Ülkemiz Açısından Önemi (HEPERKAN, D., DALKILIÇ, G., ŞENYUVA, H. Editör). Ulusal Mikotoksin Sempozyumu. 18-19 Eylül, İstanbul, 1-6.

- HOCKING, A. D., LEONG, S. L., KAZI, B. A., EMMETT, R. W., and SCOTT, E. S., 2007. Fungi and Mycotoxins in Vineyards and Grape Products. *International Journal of Food Microbiology*, 119:84–88.
- IAMANAKA, B.T., TANIWAKI, M.H., MENEZES, H.C., VICENTE, E., and FUNGARO, M.H.P., 2005. Incidence of Toxigenic Fungi and Ochratoxin A in Dried Fruits Sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants*, December 2005, 22(12):1258–1263.
- KABAK, B., DOBSON, A. D. W., and VAR, I., 2006. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:593–619.
- KABAK, B., ve VAR, I., 2006. Meyve Suyu ve Şaraplarda Mikotoksin Varlığı. *Dünya Gıda*. Kasım, 73-79.
- KARADENİZ, F., ve EKŞİ, A. 2002. Gıdalarda Mikotoksin Oluşumu ve Azaltılması. *Dünya Gıda Dergisi*, Temmuz-Ağustos 2002, 104.
- KARAGÖZLÜ, N., ve KARAPINAR, M., 2000. Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Okratoksin-A ve Fungal Kontaminasyon. *Turk J. Biol.* © TÜBİTAK, 24:561-572.
- KARBANCIOĞLU, F., ve HEPERKAN, D., 2003. Kuru Meyvelerde Okratoksin A Varlığı. I. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003, İstanbul, 188.
- KRSKA, R., and MOLINELLI, A., 2007. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387:145–148.
- LOMBAERT, G. A., PELLAERS, P., NEUMANN, G., KITCHEN, D., HUZEL, V., TRELKA, R., KOTELLO, S., and SCOTT, P. M., 2004. Ochratoxin A in Dried Vine Fruits on the Canadian Retail Market. *Food Additives and Contaminants*, 21(6):578-585.
- MACDONALD, S. J., ANDERSON, S., BRERETON, P., and WOOD, R., 2003. Determination of Ochratoxin A in Currants, Raisins, Sultanas, Mixed Dried Fruit, and Dried Figs by Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International* 86:6.

- MACDONALD, S., WILSON, P., BARNES, K., DAMANT, A., MASSEY, R., MORTBY, E., and SHEPHERD, M. J., 1999. Ochratoxin A in Dried Vine Fruit: Method Development and Survey, *Food Additives and Contaminants*, 16(6):253-260.
- MAGNOLI, C., ASTORECA, A., PONSONE, L., COMBINA, M., PALACIO, G., ROSA, C.A.R., and DALCERO, A. M., 2004. Survey of Mycoflora and Ochratoxin A in Dried Vine Fruits from Argentina Markets. *Letters in Applied Microbiology*, 39:326–331.
- MAGNOLI, C., VIOLANTE, M., COMBINA, M., PALACIO, G., and DALCERO, A., 2003. Mycoflora and Ochratoxin-Producing Strains of *Aspergillus* Section *Nigri* in Wine Grapes In Argentina. *Letters in Applied Microbiology*. 37:179-184.
- MARKAKI, P., DELPONT-BINET, C., GROSSO, F., and DRAGACCÌ, S., 2001. Determination of Ochratoxin A in Red Wine and Vinegar by Immunoaffinity High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Food Protection*. 64(4):533-537.
- MEYVACI, K. B., ALTINDİŞLİ, A., AKSOY, U., ELTEM, R., TURGUT, H., ARASİLER, Z., and KARTAL, N., 2005. Ochratoxin A in Sultanas From Turkey I: Survey of Unprocessed Sultanas From Vineyards and Packing-Houses. *Food Additives and Contaminants*, 22(11):1138–1143.
- MOLLER, T. E., and NYBERG, M. 2003. Ochratoxin A in Raisins and Currants: Basic Extraction Procedure Used in Two Small Marketing Surveys of the Occurrence and Control of the Heterogeneity of the Toxins in Samples. *Food Additives and Contaminants*, 20:1072-1076.
- NAZLI, C., 2007. Üzüm. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, T.E.A.E – Bakış, ISSN 1303-8346, 9:11. <http://www.aeri.org.tr>
- OMAYE, S.T., 2004. *Food and Nutritional Toxicology*. CRC Press LLC, Boca Raton London, New York, Washington, D.C., Chapter 13.

- ORUÇ, H. H., 2005. Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri, Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med., 24 1-2-3-4:105-110.
- OSRTRY, V., RUPRICH, J., and SKARTOVA, J., 2002. Raisins, Ochratoxin A and Human Health. 24. Mykotoxin-Workshop; Program Abstracts der Vorträge und Poster Teilnehmerverzeichnis, Berlin-Marienfelde.
- ÖZDEN, Ç., 2005. Kuru Üzüm. T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı, İGEME-İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi
- PARK, D. L., AYALA, C. E., GUZMAN-PEREZ, S. E., GARCIA, R. L., and TRUJILLO S., 2000. Microbial Toxins in Foods: Algal, Fungal, and Bacterial (edited by W. Helferich and C. K. Winter editör). Food Toxicology, CRC Press LLC, chapter 5.
- PETZINGER, E., and ZIEGLER, K., 2000. Ochratoxin A from a Toxicological Perspective. J. Vet. Pharmacol. Therap, 23:91-98.
- RICHARD, J. L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An Overview. International Journal of Food Microbiology, 119:3–10.
- Rhone Diagnostics, 1999. Quantitative Detection of Ochratoxin A. Rhone Diagnostic Technologies, Glasgow, UK.
- RINGOT, D., CHANGO, A., SCHNEIDER, Y.J., and LARONDELLE, Y., 2006. Toxicokinetics and Toxicodynamics of Ochratoxin A, an Update. Chemico-Biological Interactions, 159:18–46.
- ROMERO, S.M., COMERIO, R.M., LARUMBE, G., RITIENI, A., VAAMONDE, G., and PINTO, V.F., 2005. Toxigenic Fungi Isolated From Dried Vine Fruits in Argentina. International Journal of Food Microbiology 104:43– 49.
- SAGE, L., GARON, D, and MURANDI, S. F., 2004. Fungal Microflora and Ochratoxin A Risk in French Vineyards. Journal af Agricultural and Food Chemistry, 52:5764-5768.
- SAMSON, R.A. and VAN REENEN-HOEKSTRA, B.S., 1988. Introduction To Food-borne Fungi (3rd Edition ed.). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.

- SEÇER, E., ve İÇ, E., 2003. Kuru Üzümlerde Küflenmeye Neden Olan Aspergillus Niger van Tieghem'e Gama Işınlamasının Etkisi. VIII. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi Sözlü Bildiriler Kitabı. 15-17 Ekim 2003. Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- SMITH, J. E., 2001. Mycotoxins. In Food Chemical Safety Volume 1: Contaminants, (Edited By WATSON, D. H.) Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Abington Hall, Abington, Cambridge CB1 6AH England, Part II: Particular Contaminants. Secion 11.
- SOUFLEROS, H. E., TRICARD, C., and BOULOUMPASI, E., 2003. Occurence of Ochratoxin A in Greek Wines. Journal of the Science of Food and Agriculture. 83:173-179.
- SOYÖZ, M., ve ÖZÇELİK, N., 2002. Okratoksin A'nın Toksik Etkileri ve Eliminasyonu. T. Klin. Tıp Bilimleri, 22:421-427.
- STEFANAKI, I., FOUFA, E., TSATSOU-DRITSA, A., and DAIS, P. 2003. Ochratoxin A Concentrations in Greek Domestic Wines and Dried Vine Fruits. Food Additives and Contaminants, 20:74–83.
- ŞAHİN, İ., ve KORUKLUOĞLU, M., 2000. Küf-Gıda-İnsan. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı, Bursa,. 115.
- TAŞKAYA, B., 2003. Kuru Üzüm. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, T.E.A.E – Bakış, ISSN 1303-8346, 3:7.
- TEMİZ, A., ve ÖZKAYA, Ş., 2003. Aflatoksinler: Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri ve Detoksifikasyonları. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 01:1-21.
- TOPAL, R. Ş., 2003. Türkiye'nin Tarımsal Ürün ve Bölgelerine Göre Dominant Mikroflora Dağılımları ve Mikotoksin Profilleri (HEPERKAN, D., DALKILIÇ, G., ŞENYUVA, H. Editör). Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül, İstanbul, 111-115.
- TOSUN, H., DEMİREL, N. N., ve ÇOBAN, H., 2006. Üzüm ve Üzüm Ürünlerinde Okratoksin A Sorunu. C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 141–145.

- TUNAİL, N., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını. <http://www.mikrobiyoloji.org>
- VALERO, A., MARÍN, S., RAMOS, A. J., and SANCHIS, V. 2005. Ochratoxin A-Producing Species in Grapes and Sun-Dried Grapes and Their Relation to Ecophysiological Factors. *Letters in Applied Microbiology*, 41:196-201.
- VAR, I., and KABAK, B., (2007) Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines. *Microchemical Journal* 86:241-247.
- VAR, I., and YALÇINDAĞ, D., 2007. Determination of Ochratoxin A by ELISA and Isolation of Moulds from Grapes and Raisins Sold in Markets and Bazaar. The 2ND Safodnet Seminar. 22-23 October, İstanbul.
- VARGA, J., and KOZAKIEWICZ, Z., 2006. Ochratoxin A in Grapes and Grape Derived Products. *Trends in Food Science & Technology*, 17:72–81.
- VISCONTI, A., and GIROLAMO, A. 2005. Fitness for Purpose – Ochratoxin A Analytical Developments. *Food Additives and Contaminants, Supplement* 1:37-44.
- ZINEDINE, A., SORIANO, J. M., JUAN, C., MOJEMMI, B., MOLTO, J. C., BOUKLOUZE, A., CHERRAH, Y., IDRISSE, L., EL AOUAD, R., and MANES, J., 2007. Incidence of Ochratoxin A in Rice and Dried Fruits from Rabat and Sale Area, Morocco. *Food Additives and Contaminants*, 24(3):285-291.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Ordu'nun Aybastı ilçesinde doğdu. İlkokul Aybastı Merkez İlkokulu'nda, Orta ve lise öğrenimini Ordu Anadolu ve Ordu lisesinde tamamladıktan sonra 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans programı devam ederken 3. sınıfta "I. Bölgesel Öğrenci Gıda Sempozyumu" hazırlıklarında görev aldı ve sempozyum kitabı editörlüğü, web sayfası tasarımı ve sunuculuk faaliyetlerini yürüttü. Yine aynı sempozyumda "Günümüz Süt ve Süt Ürünleri Sektörüne Genel Bakış" başlıklı poster çalışmasını sundu. 2003 yılında mezun olduktan sonra 2004 güz yarıyılında yüksek lisans programına başladı. Yüksek lisans devam ederken Mersin-Tarsus Organize Sanayi Bölgesinde kurulmuş olan Baharat işletmesinde sorumlu yönetici olarak çalıştı. Daha sonra "Sokaktan Geleceğe" adlı Avrupa Birliği hibe projesinde eğitmen olarak görev aldı. 2006–2008 yılları arasında Özel Gıda Kontrol Laboratuvarında Kalite Yönetim Sorumlusu, pestisit ve mikotoksin laboratuvarlarında kalite kontrol mühendisi olarak çalıştı.