

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENİSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Deniz YALÇINDAĞ

**PİYASADA BULUNAN YAŞ VE KURU ÜZÜMLERDEN KÜF İZOLASYONU VE
OKRATOKSİN A'NIN ELISA YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

ADANA, 2006

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PIYASADA BULUNAN YAŞ VE KURU ÜZÜMLERDEN KÜF İZOLASYONU
VE OKRATOKSİN A'NIN ELISA YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

Deniz YALÇINDAĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**Bu tez 21.12.2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği İle
Kabul Edilmiştir.**

İmza:..... İmza:..... İmza:.....
Yrd. Doç .Dr .İşıl VAR Prof. Dr. Bülent EVLİYA Prof. Dr. Semih TANGOLAR
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

**Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.**

Proje No: ZF.2005.YL.30

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

PİYASADA BULUNAN YAŞ VE KURU ÜZÜMLERDEN KÜF İZOLASYONU
VE OKRATOKSİN A'NIN ELISA YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

Deniz YALÇINDAĞ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR

Yıl: 2006, Sayfa:51

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR

Prof. Dr. Bülend EVLİYA

Prof. Dr. Semih TANGOLAR

Son yıllarda, kanserojenik ve genotoksik etkilerinin ortaya konması nedeni ile bir küf toksini olan Oktatoksin A (OTA) ülkemiz için önemli ihraç ürünleri olan yaş ve kuru üzümlerde hem ekonomi hem de sağlık açısından bir sorun haline gelmiştir.

Üzümde; *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından oluşturulan OTA'nın oluşumunda iklim koşullarının, ürünün olgunluk durumunun, pestisit kullanımının, üzümün hasat edilme ve depolama koşullarının ve ürüne yapılan işlemlerin, OTA miktarında etkili olduğu belirtilmektedir.

Bu çalışmada, Çukurova bölgesinde yetiştirilen ve satışa sunulan yaş üzümlerle piyasada bulunan Sultani kuru üzümlerden küf izolasyonları yapılmış ve OTA varlığı araştırılmıştır.

Elde edilen bulgulara göre, analizi yapılan 22 yaş ve 22 kuru üzüm örneğinde OTA, kuru üzüm örneklerinde, 5,2-18,2 ppb düzeyinde bulunurken; yaş üzüm örneklerinde 0,2-0,7 ppb düzeyinde tespit edilmiştir. Araştırmamızda kuru üzümde elde ettiğimiz bulguların birçoğunun Türk Gıda Kodeksinde kabul edilen, maksimum OTA limitini (10 µg/kg) aştığı görülmüştür. Küf olarak yaş ve kuru üzümlerden, *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* ve *Moniliella acetoabutens* izole edilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Yaş üzüm, kuru üzüm, okratoksin A, ELISA

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINATION OF OCHRATOXIN A BY ELISA TEST AND ISOLATION OF MOULDS FROM GRAPES AND RAISINS SOLD IN MARKETS AND BAZAAR

Deniz YALÇINDAĞ

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

Supervisor : Asist. Prof. Dr. Işıl VAR

Year : 2006, Sayfa: 51

Jury : Asist. Prof. Dr. Işıl VAR

Prof. Dr. Bülend EVLİYA

Prof. Dr. Semih TANGOLAR

Recently, Ochratoxin A (OTA), known as a mould toxin was found in raisins and grapes which are important export product of Turkey. This has known a great economic burden because many export products were returned due to OTA. Also it has become a health problem because of its cancerogenic and genotoxic effects.

In grapes, climate, ripening, using pesticide, harvest and storage conditions, food processing effect the amount of OTA produced by the species of *Aspergillus* and *Penicillium*.

In this research quantity of OTA has been determined and moulds are isolated from grapes grown and sold in Çukurova region and raisins sold in markets and bazaars.

Results show that; in 22 grapes and 22 raisins samples OTA amount is found between 5,2-18,2 ppb and 0,2-0,7 ppb in raisins and grapes, respectively. It is observed that OTA is found in excessive quantities above the Turkish legal limit of $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ in most of the raisin samples. As a mould *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* and *Moniliella acetoabutens* are isolates from grapes and raisins.

Key words : Grape, raisin, ochratoxin A, ELISA

TEŞEKKÜR

Araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde bana yol gösteren danışman hocam Sn. Yrd. Doç. Işıl VAR'a, araştırmanın ön çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Bülent KABAK'a, ELISA reader ile ilgili yardımlarını esirgemeyen Bitki Koruma Bölümünden Prof. Dr. Sadettin BALOĐLU'na, Ziraî Mücadelede çalışan ve sonuçları okuma sırasında yardımcı olan Uzman Hakan FİDAN'a ve çalışmamda emeği geçen Mikrobiyoloji Bölümündeki tüm çalışanlara,

Tezi yazma aşamasında manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Cemil ÇİÇEKTAŐ ve annem Aliye YALÇINDAĞ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
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	4
2.1. Küfler ve Mikotoksinler.....	4
2.1.1. Küfler ve Mikotoksinler Hakkında Genel Bilgi.....	4
2.1.2. Mikotoksikozis ve Neden Olan Küfler.....	7
2.1.3. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	9
2.2. Okratoksin A.....	10
2.2.1. Yaş ve Kuru Üzümlerden İzole edilen ve OTA Üreten Bazı Küfler.....	14
2.2.1.1. <i>Aspergillus ochraceus</i>	14
2.2.1.2. <i>Aspergillus niger</i>	14
2.2.1.3. <i>Penicillium verrucosum</i>	15
2.2.1.4. <i>Penicillium citrinum</i>	15
2.3. Yaş ve Kuru Üzümlerden Küf İzolasyonu İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	15
2.4. Yaş Üzümde OTA Varlığı İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	17
2.5. Kuru Üzümde OTA Varlığı İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	19
2.6. ELISA Yöntemi.....	20
2.6.1. Okratoksin A Varlığının ELISA Yöntemi ile Saptanması.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Üzüm.....	22
3.1.2. Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar.....	23

3.1.3 OTA ELISA Kiti.....	23
3.2.Yöntem.....	25
3.2.1. Yaş ve Kuru Üzümlerden Küf İzolasyonu	25
3.2.2. Yaş ve Kuru Üzümlerden İzole Edilen Küflerin Tanımlanması.....	25
3.2.3. Yaş ve Kuru Üzümlerde OTA Varlığının Araştırılması.....	25
3.2.3.1 Yaş Üzüm Ekstraksiyonu.....	26
3.2.2.2 Kuru Üzüm Ekstraksiyonu.....	27
3.2.2.3 ELISA Test Prosedürü.....	28
3.2.3.4. Sonuçların Okunması ve Değerlendirilmesi.....	30
4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Yaş ve Kuru Üzümlerden Küf İzolasyonu.....	31
4.2. Yaş ve Kuru Üzümlerde OTA Varlığı.....	38
4.2.1. Yaş Üzümlerde OTA Varlığı.....	38
4.2.2. Kuru Üzümlerde OTA Varlığı.....	41
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Önemli mikotoksinler, üretici küfler, etkileri ve buldukları ürünler.....	8
Çizelge 2.2. Okratoksin üreten küflerin oluşturdukları diğer mikotoksinler ve etkileri.....	11
Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Yaş Üzüm Örnekleri ve Temin Edildiği Yerler	22
Çizelge 4.1. Yaş Üzümlerde Küf Sayım Sonuçları.....	33
Çizelge 4.2. Kuru Üzümlerde Küf Sayım Sonuçları.....	34
Çizelge 4.3. Yaş Üzüm Örneklerindeki OTA Düzeyleri.....	40
Çizelge 4.4. Farklı Üzüm Çeşitlerinde OTA Düzeyleri.....	40
Çizelge 4.5. Kuru Üzüm Örneklerindeki OTA düzeyleri.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1 Okratoksin A'nın Kimyasal Yapısı.....	12
Şekil 2.2 Okratoksin'nin Kimyasal Yapısı.....	12
Şekil 3.1 Yaş üzüm ekstraksiyonu akış şeması.....	26
Şekil 3.2 Kuru üzüm ekstraksiyonu akış şeması.....	27
Şekil 3.3 ELISA Test Prosedürü akış şeması.....	29

RESİMLER DİZİNİ

SAYFA

Resim 3.1 Ridascreen OTA ELISA Test Kiti.....	24
Resim 3.2 Ridascreen OTA ELISA Test Standartları, Substrat, Kromogen, Durdurma Çözeltileri ve Mikrotiter Kuyucukları.....	24
Resim 3.3 Titertek Multiscan Plus ELISA okuyucusu	30
Resim 4.1 Potato Dekstroz Agar (PDA) besiyerinde <i>Aspergillus niger</i> kolonilerinin önden görünüşü	35
Resim 4.2 PDA besiyerinde <i>Aspergillus niger</i> kolonilerinin arkadan görünüşü	35
Resim 4.3 PDA besiyerinde <i>Penicillium citrinum</i> kolonilerinin önden görünüşü.....	36
Resim 4.4 PDA besiyerinde <i>Penicillium citrinum</i> kolonilerinin arkadan görünüşü	36
Resim 4.5 PDA besiyerinde <i>Moniliella acetoabutens</i> kolonilerinin önden görünüşü	37
Resim 4.6 PDA besiyerinde <i>Moniliella acetoabutens</i> kolonilerinin arkadan görünüşü	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

cfu	Colony Forming Unit
CzA	Czapek-Doks Agar
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization
GAP	Good Agriculture Process
kob	Koloni Oluřturma Birimi
OTA	Okratoksin A
PDA	Potato Dextrose Agar
ppb	Parts per billion
TGK	Türk Gıda Kodeksi
WHO	World Health Organization

1.GİRİŞ

Okratoksinler, *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsine giren türler tarafından oluşturulan ikincil metabolizma ürünleridir. OTA'nın da içinde bulunduğu, yapı benzerliği bulunan yedi metabolit Okratoksin grubunda yer almaktadır (Soufleros ve ark, 2003).

Okratoksin A (OTA), *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsine giren türler tarafından üretilmektedir. OTA'nın bütün hayvan türleri için kuvvetli bir nefrotoksik kanserojenik, teratojen etkiye sahip, immunosupresif, genotoksik, akut ve kronik etkili, bir bileşik olduğu bildirilmektedir (Battilani ve Pietri, 2002).

OTA'nın, insan ve hayvan sağlığı açısından yarattığı risk, özellikle; kanserojenik ve genotoksik etkilerinin ortaya konması nedeni ile giderek önem kazanmıştır. (Aksoy ve ark., 2003). OTA'nın Avrupa ülkelerinde ortaya çıkan Balkan nefropatisinin de nedeni olduğu saptanmıştır (Markaki ve ark. 2001).

Yapılan araştırmalarda birçok araştırmacı; OTA'nın ppb düzeyinde insan vücuduna alındığını, bu mikotoksinin insanın bazı organlarında biriktiğini ve öncelikli olarak böbrek ve karaciğerlere etki ettiğini saptamışlardır (Şahin ve Korukluoğlu 2000; Markaki ve ark. 2001).

Doğal gıda kontaminantı olarak bilinen küfler ve bunların ürettiği Okratoksinler, gıda maddesine ürünün gelişimi, hasat, taşıma ve depolama aşamalarında kontamine olabilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, hasat öncesi dönemde yağış ve benzeri koşullara maruz kalan taze üzümde OTA oluşumu gözlenmiştir. Taze üzümün işlenmesi ile elde edilen başta kuru üzüm olmak üzere, sirke, şarap ve pekmezde de OTA'ya rastlanmaktadır. (Eltem ve ark, 2003)

Birçok ülke kendisi için önemli bulduğu gıdalara OTA sınır değerleri koymuştur. Türkiye'de de OTA limit değerleri ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.(Heperkan, 2003; Heperkan, 2005).

Gıdalarda bulunabilecek (tolere edilebilir) en yüksek miktarlar yasal düzenlemelerle belirlenmekte, her ülkenin limit değerleri farklı olsa da uluslar arası ticarete belli normlara yaklaşmak için çaba sarfedilmektedir (Anonymous, 2006a).

Gıda maddelerinden, OTA ile kontamine olmuş ürünlerde toksini belirlemeye yönelik günümüzde hassas ve güvenli birçok yöntem bulunmaktadır. OTA'nın kromatografik yöntemlerle ve immunokimyasal test kitleri ile analizi yapılabilmektedir. ELISA yöntemi de immunokimyasal test kitleri ile yapılan bir yöntemdir. Bu metodun diğer yöntemlere göre avantajı ön işlemlerin çok azaltılmış olması, işlemin kısa sürmesi, 1mg/kg^{-1} mikotoksin veya altındaki miktarların saptanabilmesidir (Anonymous, 2006a).

Ülkemizin çeşitli bölgelerinde, oldukça fazla sayıda ve geniş alanlarda bağcılık yapılmaktadır ve bu sektörün üretim ihraç ettiği çekirdeksiz kuru üzümler büyük ekonomik öneme sahiptir. Türkiye üretim alanı yönünden 567.000 ha ile (dünya bağlarının % 6.84'ü) dördüncü sırada yer almaktadır. Dünyada yaş üzüm ihracatı yönünden 3.7 milyon ton ile beşinci sırada, sofralık üzüm üretiminde 921.000 ton ile ikinci sırada ve kuru üzüm üretiminde ise 360.000 ton ile birinci sırada yer almaktadır. Kuru üzüm ihracatı yönünden de Türkiye, ABD'den sonra 118.000 ton ile ikinci sırada yer almaktadır. Örneğin, 1997-98 sezonunda yapılan kuru üzüm dış satımı 180.000 ton dolayında gerçekleşmiş ve 180-200 milyon dolarlık döviz girdisi sağlanmıştır (Eltem ve ark., 2003). Üretilen üzümün önemli bir kısmının sofralık ve kurutmalık olarak değerlendirildiği, geri kalan kısmının ise şarap, damıtık alkollü içki, sirke, pekmez, üzüm suyu gibi ürünlere işlendiği görülmektedir.

Mikotoksinler içerisinde yüksek toksisiteye sahip olan, genotoksik, teratojenik, kanserojenik ve nefrotoksik etkileri nedeniyle son yıllarda üzerinde birçok araştırmanın yapıldığı OTA'nın, ülkemiz için önemli bir ihraç ürünü olan yaş ve kuru üzümde önemli miktarda bulunabildiği ve ülkemizde, üzüm yetiştirilen bölgelerdeki çevre koşullarının OTA oluşumu açısından uygun olduğu saptanmıştır. Son yıllarda kuru üzüm ve şaraplarda OTA varlığı, ülkemizin de içinde bulunduğu üzüm yetiştiriciliğinin yaygın olduğu ülkelerde önemli bir sorun haline gelmiştir (Eltem ve ark., 2003).

Bu nedenle bu çalışmada, hem ekonomi hem de sağlık açısından sorun yarattığı bilinen OTA'nın bölgemizde tüketime sunulan yaş ve kuru üzümlerdeki varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Yöntem olarak ELISA yöntemi kullanılmıştır.

Bunun yanısıra bu üzümlerden küf izolasyonları yapılarak, izole edilen küflerin tanımlanması ve tanımlanan küflerin OTA üreten küfler olup olmadığı da araştırılmıştır.

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

Küfler hemen her yerde yayılmış olan, heterotrof, filamentli (uzantılı) ve çok hücreli funguslardır. Gıdalarda bulunan filamentli funguslar denildiğinde taksonomide Mycobiota (funguslar alemi) içinde Zygomycota, Ascomycota, Deutermycota bölümleri altında yer alan değişik cins ve türdeki funguslar akla gelmektedir (Temiz, 1994).

Küf hücreleri ard arda dizilerek, hif adı verilen hücre iplikciklerini oluştururlar. Hifler çeşitli dallanma ve budaklanma yaparak, karmaşık bir hif topluluğu oluşturacak şekilde bir araya gelirler. Bu hif topluluklarına miselyum adı verilmektedir. Aynı koloni içinde bulunan hiflerden bazıları beslenmeyi sağlamak için üzerinde yaşadıkları substratların içine doğru uzanırlar. Genelde beslenmeyi sağladıkları için bunlara beslenme hifi (vegetatif hif) adı verilmektedir. Substratın üzerinde kalan ve genellikle küflerin üreme organelleri olan sporları taşıyan hiflere ise hava hifi (föertil hif) adı verilmektedir (Temiz, 1994).

Hifler, ortalama 5-6 µm çapındadır. Bazı küflerde bölmeler bulunmaktadır. Hücre duvarı ancak bölmeli hiflerde söz konusudur ve küf hücrelerinin büyüklüğünü ve şeklini tayin edebilecek derecede kuvvetli bir yapıya sahiptir (Arda, 1997).

Küfler gelişimleri için temel olarak su, oksijen ve makro elementlere (karbon, potasyum, fosfor, nitrojen) gereksinim duymaktadır. Küfler suda erimiş halde bulunan besinlerini difüzyon yoluyla alırlar ve zengin enzim sistemleri sayesinde çok sayıda besin maddesinden yararlanabilirler. Küfler karbon ve enerji kaynaklarını karşılamak amacıyla genellikle glikozdan yararlanırlar. Bunun yanısıra sakkaroz, nişasta ve maltoz gibi kompleks karbon bileşikleri de küfler tarafından kullanılabilir. Bazı küfler yağ asitlerini, organik asitleri, gliserolü, heksoz ve pentoz şeker türevlerini de kullanabilmektedir (Kabak, 2002).

Küfler genellikle düşük pH derecelerinde bile kolayca üreyebilir ve böyle ortamlara adapte olabilirler. Bu sebeple, küflerin minimal ve maksimal pH-limitleri 2-11 arasında değişebilmekle birlikte optimum olarak 5-6 arasında gelişmektedirler (Özkaya ve ark., 1999). Asit karakterdeki meyveler veya suları buzdolabı sıcaklığında olsalar bile küflerin üremeleri için iyi bir ortam oluştururlar. Bunlara karşın, küflerin türlerine göre değişmek üzere, optimal pH'ları, üreme ve çeşitli metabolit sentezi ile paralellik göstermeyebilir. Buna, diğer çevresel koşulların ve üreme ortamının yapısının da büyük etkisi bulunmaktadır (Arda, 1997).

Nem, küflerin üremelerinde çok önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır. Yüksek orandaki nem, genellikle, üreme üzerine olumlu etkide bulunur. Nem azaldıkça, küflerin çoğalmaları da sınırlanmaya başlar. Küflerin neme olan gereksinimleri, türler arasında değişiklik gösterir. Bazı küf türleri nisbi nemi %10-15 arasında bulunan ortamlarda veya suyun çok az olduğu kuru danelerde bile üreme yeteneğine sahiptirler (Arda, 1997).

Küflerin üreme sıcaklık limitleri oldukça geniştir ve türler arasında farklılık göstermektedir. Küfler 0-60°C gibi oldukça geniş sıcaklık aralığında gelişebilmelerine rağmen optimum olarak 22-32 °C'de gelişirler. Hüfler maksimal sıcaklık limitinin dışında kolayca ölmelerine karşılık, sporları yüksek ısıya ve değişik çevre koşullarına çok fazla dayanıklılık gösterirler (Arda, 1997).

Küfler, genellikle, aerobiktir ve oksijenin bulunduğu ortamlarda gelişirler ve ürerler. Oksijenin azlığı üremeyi ve gelişmeyi sınırlar. Küflerin üremeleri için ışık önemli bir faktör değildir. Işık olmadan da kolayca gelişebilirler (Arda, 1997).

Tarımsal ürünler hasattan başlayarak işleme ve depolama aşamalarında ortam koşullarına, tarım ürününün bileşimine ve su içeriğine bağlı olarak değişik küflerle kontamine olurlar. Küflerle kontaminasyon iki açıdan önemlidir. Yakın zamana kadar tarımsal ürünlerdeki küflerin varlığı yalnızca bozulmalar, ürünün besin değerindeki kayıplar, danelerin çimlenme kabiliyetindeki düşüşler nedeniyle ve özet olarak ekonomik açıdan önemli görülmüştür (Arda, 1997).

Küflerin verdiği ekonomik zararlar, tarım ürünlerindeki kayıplar dikkate alındığında gerçekten azımsanamayacak düzeydedir. Ancak gıda ve yemlerde gelişen fungusların gelişme sürecini tamamladıktan sonra miselleri içerisinde oluşturdukları

ve birçok durumda üzerinde buldukları ürüne (substrata) salgıladıkları toksik metabolitler, insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiğinden, küflenme ekonomik boyutun ötesinde önem taşımaktadır (Topal ve ark., 2003). Fungusların sekonder metabolit olarak ürettikleri bu toksik maddelere mikotoksin denilmektedir. Bu metabolitler birincil metabolitler gibi küflerin büyümeleri için gerekli olmamakla birlikte üreme sırasında vejetatif misellerde sentezlenirler ve büyüme ortamına geçebilirler. Gıda ve yemler çok çeşitli küflerin saldırısına hedef olmaktadır. Mikotoksinler, bitki patojeni olarak bilinen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* başta olmak üzere bazı patojenik ve bozulma etmeni küfler tarafından üretilmekte olup doğada 250 den fazla küf türünün (besin ihtiyaçları ve uygun ortam sağlanırsa) mikotoksin oluşturduğu ve bunlardan ancak 20 tanesinin insan ve hayvanlar için toksik özellik taşıdığı belirtilmektedir (Bozoğlu, 2003).

Küçük molekül yapısına sahip mikotoksinlerin, bunları üretme yeteneğinde olan küfler tarafından her zaman, her koşulda üretilebileceklerini düşünmek yanlıştır. Mikotoksin sentezi için özel koşulların oluşması gerekir. Her ürünün yapısına, bileşimine, içerdiği nem oranına, bulunduğu klima koşullarına göre ürünün üzerinde gelişen küf cinsleri, türleri, oranları, oluşturdukları mikotoksin çeşitleri ve miktarları değişmektedir. Mikotoksinleri, sentezlerini gerçekleştiren küf cins veya türlerine göre ayırt etmek, sınıflandırmak mümkün değildir. Bunun sebebi; bir mikotoksin değişik fungus türleri tarafından sentezlenebildiği gibi, bir fungus türü de eş zamanlı olarak farklı mikotoksinler oluşturabilir (Bozoğlu, 2003).

Mikotoksinlerin kimyasal yapıları incelendiğinde çoğunun aromatik yapıda olduğu, daha az bir kısmının da alifatik bileşiklerden oluştuğu görülür. Genellikle yüksek sıcaklıklara dirençlidirler ve bu dirençleri, mikotoksin çeşidine, sıcaklık derecelerine ve uygulama sürelerine göre farklılık gösterirler. Genellikle küfler kendilerinin sentezledikleri toksinlerden olumsuz etkilenmezler. Mikotoksinler bakteri toksinlerinin aksine küçük moleküllü bileşikler olduğundan bunların immunolojik yöntemlerle belirlenmesinde poliklonal antikorlar (antiserumlar) yeterli olmaktadır. Oysa bakteriyel toksinlerin belirlenmesinde 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 tehlikesinin ortadan kalkmadığı bilinmektedir (Arda, 1997). Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda mikotoksinlerin az da olsa sporlarda da sentezlenebildiği tespit edilmiştir (Mello ve Macdonald, 1997).

2.1.2. Mikotoksikozis ve Neden Olan Küfler

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı dünya genelinde, üretilen tarım ürünlerinin yaklaşık %25'inin ciddi boyutta mikotoksinlerle kontaminasyona uğradığını bildirmektedir. Mikotoksinlerin bir kısmı gıdalarda kaçınılması imkansız tehlikeler olarak kabul edilmekte, diğer bir kısmı ise hasat, depolama, kurutma işlemleri sırasındaki dikkatli uygulamalar ve diğer teknolojik işlemlerle önlenemekte veya azaltılabilmektedir (Heperkan, 2003). Mikotoksinler içerisinde, insan sağlığı üzerinde yarattığı sorunlar ve ekonomik etkileri açısından önem derecelerine göre aflatoksinler, OTA, trikotesenler, fumonisin B₁, zearalenon ve patulin üzerinde en fazla durulan mikotoksin türlerini oluşturmaktadır (Kabak ve Var, 2006). Çizelge 1.1'de gıda ve tarım ürünlerinde rastlanan mikotoksinleri, üreticilerini ve bu mikotoksinlerin en fazla görüldüğü gıdalar ile memeli hayvanlar üzerindeki etkilerini gösterilmektedir.

Mikotoksinlerin tüketimi sonucu insan ve hayvan gibi yüksek yapılı canlılarda görülen toksik sendromlara "mikotoksikozis" adı verilmektedir (Anonymous, 2006b). Mikotoksinler, doğrudan mikotoksin içeren gıdaların tüketimi sonucu insan vücuduna alınabildiği gibi, hayvanlar tarafından mikotoksinlerle kontamine olmuş yemlerin tüketimi sonucu bu mikotoksinler ete, süte ve yumurta gibi hayvansal ürünlere geçebilmekte, bu ürünlerin tüketilmesi sonucu insan vücuduna alınabilmekte ve bunun sonucunda akut, kronik, mutajenik ve teratojenik etki görülmektedir (Özkaya ve ark., 2003). Mikotoksinlerin insan ve hayvanlara karşı toksik etkisi; toksin türüne, etki mekanizmasına, alınan doza, toksine maruz kalma süresine, yaşa, metabolizmaya ve savunma mekanizmasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. 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, 2004). Diğer yandan trikotesen ve zearalenon için insanlara karşı kanserojenik etkisinin bulunmadığı (3B grubu) belirtilmiştir (Kabak ve Var, 2006).

Çizelge 2.1 Önemli mikotoksinler, üretici küfler, etkileri ve buldukları ürünler (Doyle ve ark., 1997)

Mikotoksin	Toksini üreten fungus türleri	Memeli hayvanlara etkileri	Bulduğu ürünler
Aflatoksin	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	hepatotoksik, kanserojen, teratojen (AFB ₁).	Yer fıstığı, Antep fıstığı, fındık, süt, peynir, kırmızı biber ve çeşitli baharatlar
OTA	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> <i>P. verrucosum</i> <i>P. citrinum</i>	nefrotoksik, hepatotoksik, teratojen, immunosupresif	Üzüm suyu, kuru üzüm, kuru incir, şarap, kahve mısır, malt
Sitrinin	<i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. verrucosum</i>	nefrotoksik, nörotoksik	Pirinç, arpa, buğday ve unları, meyve suları
Patulin	<i>Pen. Expansum</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>	nörotoksik, hücreye toksik	Meyveler ve meyve suları
Sterigmatosistin	<i>A. versicolor</i> , <i>A. rugolosis</i>	kanserojen	Buğday, yer fıstığı
Trikotesenler (T-2 Toksin)	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>	düşük dozlarda kusma, lökopeni, deri nekrozları.	Buğday, pirinç, tahıllar
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i>	östrojen benzeri etki.	Mısır, buğday, arpa, pirinç, yem.

2.1.3. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Mikotoksin oluşumunu etkileyen bir çok faktör bulunmakla beraber, bunların başında çevresel faktörler gelmektedir. Bitki veya gıdanın nem içeriği, atmosfer bağıl neminden etkilendiğinden sıcaklıkla birlikte bağıl nem öncelikle fungus sporlarının çimlenmesini ve misellerin gelişmesini ardından da toksin oluşumunu etkileyen en önemli faktör olarak bildirilmektedir (Deacon, 1997).

Mikotoksin üretimini etkileyen diğer faktörler;

- a.Küf türü
- b.Bitki veya gıdanın çeşidi
- c.Büyüme ortamı
- d.Isı
- e.Ürünün olgunluk durumu
- f.Hasat
- g.Ürüne yapılan işlemler
- h.Depolama

Dış etkilerin mikotoksin üretimi üzerindeki etkinlikleri bilinmesine rağmen bu toksinlerin biyokimyasal sentezleri tamamıyla anlayamamıştır. Yapılan çalışmalar toksin üretimi için bir çok genin bulunduğunu ve bu genleri aktive ederek toksin sentezleme mekanizmalarını başlatacak aktivatör veya durduracak deaktivatör kimyasalların olduğunu göstermektedir (Bozoğlu, 2003).

Çalışmamıza konu olan üzüm ve OTA açısından değerlendirdiğimizde, üzümlerde OTA varlığı ve miktarının sıcaklık, yağmur ve nispi nem gibi iklim faktörlerine, üzümün olgunluğuna ve kalitesine göre değişiklik gösterebildiği belirtilmektedir. (Battilani ve Pietri, 2002).

OTA'yı oluşturan potansiyel okratoksijenik küflerin ana kaynağının toprak olduğu bildirilmiştir. Topraktaki fungusların üzüm tanelerine ulaşmasını azaltabilmek için sulamaların ben düşme döneminden sonra azaltılması böylece tozu havaya kaldıracak olan toprak işçiliğinden kaçınılması, üzüm tanelerinde fungus girişini sağlayacak çatlama ve yüzey zedelenmelerini azaltmak amacıyla bitki

koruma önlemlerinin çok dikkatli yerine getirilmesi, hasat sırasında hasarlı ve küflü salkımların hasat edilmemesi, sergide üzümlerin kalın tabaka oluşturmayacak şekilde ve taneleri zedelemeyen serilmesi gibi kültürel tedbirler üretim aşamasında bağda başlayan OTA oluşumunu engellemede önemli etkenler olduğu belirtilmektedir (Altındışli, 2003).

2.2. Okratoksin A

OTA'nın da içinde bulunduğu, yapı benzerliği bulunan yedi metabolit okratoksin grubunda yer almaktadır. *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsi küfler tarafından üretilen OTA, 1965 yılında laboratuvar denemeleri sırasında bulunmuş ve ilk olarak *A. ochraceus* küfünden izole edilmiştir. OTA'nın önceleri sadece *A. ochraceus*, *A. melleus* ve *A. ostianus* ve *A. petrakii* tarafından oluşturulduğu sanılmışsa da daha sonra *Penicillium* cinsine giren bazı türlerin de OTA sentezledikleri saptanmıştır. Bunlar arasında özellikle *P. verrucosum*' un ayrı bir öneme sahip olduğu bildirilmektedir (Anonymous, 2006a).

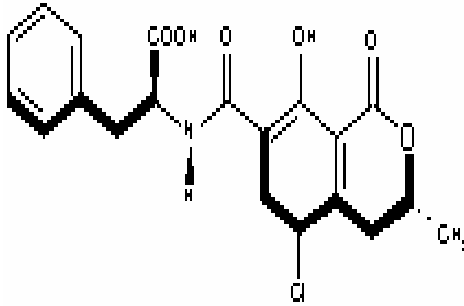
Diğer önemli OTA üreticileri olarak *A. alutaceus*, *P. aurantiogriseum* ve *P. commune* sayılabilir. Ancak OTA üreten türler bunlarla sınırlı değildir. Okratoksin gıdalarda genellikle sitrinin ve penisilik asitle veya başka mikotoksinlerle beraber görülür, çünkü okratoksin üreticisi *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri yan metabolitler olarak birkaç mikotoksini daha eş zamanlı sentezleyebilmektedirler. Çizelge 2.2'de OTA üreticisi fungus türü ve sentezledikleri diğer mikotoksinler gösterilmektedir. (Anonymous, 2006a).

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

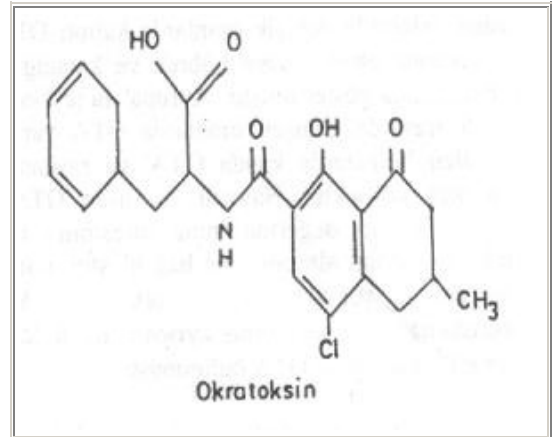
OTA üretici fungus türü	Üretmiş oldukları diğer mikotoksinler
<i>Aspergillus alliaceus</i>	Kojikasit ¹ , penisilik asit ²
<i>A. glaucus</i> (<i>Eurotium</i> spp.)	Kojikasit
<i>A. melleus</i>	Penisilik asit
<i>A. ochraceus</i>	Penisilik asit, viomellein ² , ksantomegnin ²
<i>A. ostianus</i>	Penisilik asit
<i>A. petrakii</i>	Penisilik asit
<i>A. sclerotiorum</i>	Penisilik asit
<i>A. sulphureus</i>	Penisilik asit
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Patulin ³ , penisilik asit, penisilin ⁴
<i>P. puberulum</i>	Penisilik asit
<i>P. crustosum</i>	Viomellein, ksantomegnin
<i>P. aurantiogriseum</i>	Siklopiazonikasit ⁵ , patulin, sitrinin ² , penisilik asit, viomellein, ksantomegnin, rugulosin ⁶
<i>P. palitans</i>	Sitrinin, penisilik asit, penitrem A ⁷
<i>P. purpurescens</i>	Sitrinin, penitrem A
<i>P. purpurogenum</i>	Rubratoksin A, rubratoksin B ^{2,6}
<i>P. variabile</i>	Patulin, rugulosin ⁸
<i>P. verrucosum</i>	Penisilik asit
<i>P. viridicatum</i>	Penisilik asit, sitrinin, viomellein, ksantomegnin, siklopiazonikasit, penitrem A, griseofulvin
1: hafif mutajen, 2: nefrotoksik, 3: hücreye toksik, 4: antibiyotik, 5: nörotoksik, 6: kanserojen, 7: tremorjen (titremeye neden olan), 8: hepatotoksik	

OTA üretici türün tüm suşları tarafından oluşturulmaz. Örneğin test edilen 48 *A. ochraceus* suşundan 8'inin (% 16.7) toksin üretme yeteneği gösterdiği saptanmıştır (Anonymous, 2006a).

OTA; suda az çözünen, renksiz ve kristal yapıya sahiptir. UV ışınları altında mavi renkte floresan verir. Fenilalanin, Cl ve OH içeren dihidroizokumarin olarak bilinen kimyasal yapıya sahiptir. Şekil 2.1'de OTA'nın; Şekil 2.2'de ise Okratoksin'in kimyasal yapısı gösterilmiştir. OTA'nın Cl içermeyen derivatı okratoksin B, etilester derivatı ise okratoksin C olarak adlandırılmıştır. Bu iki derivatın gıdalarda görülseler de düşük konsantrasyonda bulduklarından fazlaca önem taşımadıkları belirtilmektedir (Aşkun, 2003).



Şekil 2.1 Okratoksin A'nın Kimyasal Yapısı (Abarca ve ark., 2001)



Şekil 2.2 Okratoksin'in Kimyasal Yapısı (Anonymous, 2006a)

OTA'nın insanlar üzerindeki etkisine ilişkin somut kanıtlar olmamakla beraber Bulgaristan, Yunanistan, Romanya ve Yugoslavya gibi bazı ülkelerde görülen Balkan nefropatisi (kronik böbrek hastalığı) olarak adlandırılan öldürücü böbrek hastalığının nedeni olduğu bildirilmektedir (Battilani ve Pietri, 2002). Bunun yanı sıra 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 (Cabanés ve ark., 2002; Battilani ve Pietri, 2002).

Uluslar arası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından “muhtemel kanserojenik madde (2B grubu)” grubunda sınıflandırılmıştır (Battilani ve Pietri, 2002; Cabanes ve ark., 2002).

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) Gıda Katkıları Uzman Komitesi ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), tolere edilebilir OTA miktarını $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ vücut ağırlığı/hafta ve 14ng vücut ağırlığı/gün olarak belirlemişlerdir (Soufleros ve ark., 2003). Avrupa Birliği Gıda Bilimsel Komitesi (The Scientific Committee on Food of the European Union) ise, maksimum günlük kabul edilebilir OTA miktarını 5ng kg^{-1} vücut ağırlığı olarak bildirmişlerdir. Avrupa’da kuru üzümde maksimum OTA miktarı $10 \mu\text{gkg}^{-1}$ olarak belirlenirken, şaraplarda bulunabilecek maksimum OTA miktarı 2ng ml^{-1} olarak belirlenmiştir (Anonymous, 2006b; Anonymous, 2006d; Soufleros ve ark., 2003).

Ülkemizde yaş üzüm ve şarap için herhangi bir yasal limit bulunmamaktadır. Ancak 2002 yılında Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde, Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ’de kuru üzümde kabul edilebilir maksimum OTA miktarı $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Anonymous, 2006e; TKG, 2002; Sabancı, 2003).

Birçok ülke kendisi için önemli bulduğu gıdalara OTA sınır değerleri koymuştur. Tahıllarda bulunabilecek maksimum OTA miktarı İsviçre’de $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$, Hollanda’da $3 \mu\text{g.kg}^{-1}$, Fransa ve Avusturya’da $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$, İngiltere’de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ olarak benimsenmiştir. Yunanistan kahve için $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$, Macaristan ve Çek Cumhuriyeti de tüm gıdalar için $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ OTA konsantrasyonu sınır değerlerini kullanmaktadır. Fransa çocuklar için sütlerde $0.03 \mu\text{g.kg}^{-1}$, Çek Cumhuriyeti de tüketime hazır çocuk gıdalarında $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ OTA sınır değerini yasal olarak kabul etmiştir. Avrupa birliği ise OTA için gıdalarda $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ sınır değerini koymuşlardır (Anonymous, 2006d).

İnsanlarda görülen OTA’ nın asıl kaynağının her ne kadar hayvansal ürünler olduğu bildirilmekteyse de OTA’ nın üzüm suyu, kuru üzüm, kuru incir, şarap, kahve, tahıllar, mısır, maltta da bulunduğu ve risk oluşturduğu belirtilmektedir (Doyle ve ark., 1997; Anonymous, 2006a).

2.2.1. Yaş ve Kuru Üzümlerden İzole edilen ve OTA Üreten Bazı Küfler

Üzümlerde *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Uncinula* ve *Plasmopara* cinsi küfler bulunduğu; OTA üreten küflerden en önemlisinin *A. ochraceus* olduğu ve OTA'nın ilk olarak *A. ochraceus* küfünden izole edildiği bilinmektedir. (Magnoli ve ark., 2003).

Penicillium cinsine giren bazı türlerin de OTA sentezledikleri ve bunlar arasında özellikle *P. verrucosum*' un ayrı bir öneme sahip olduğu belirtilmektedir. (Cabanes ve ark., 2002).

OTA ayrıca çalışmamızda da izole edilen *A. niger* ve *P. citrinum* tarafından da düşük konsantrasyonlarda sentezlenmektedir.

2.2.1.1 *Aspergillus ochraceus*

A. ochraceus kserofilik küflerden sayılmaktadır. Spor çimlenmesi ve gelişimi için minimum su aktivite değeri $A_s=0.76-0.83$ ve optimum gelişme sıcaklığı ise 28 °C dir. *A. ochraceus*, OTA oluşturabilmek için 20 - 30 °C sıcaklığa gereksim duyar.

Maksimum düzeyde oluşturduğu toksinini 30 °C de % 95 bağıl nemde üretir. Sıcaklık derecesi azalırda daha yüksek bağıl nem ihtiyacı doğar. Örneğin 15 °C de % 99 bağıl nem gerekir. Sıcak iklimlerde OTA kontaminasyonundan sorumlu küf olarak *A. ochraceus* gösterilmektedir. *Aspergillusların* optimum gelişme sıcaklığının altında sentezledikleri OTA miktarı azalırken penisilik asit miktarı artmaktadır.

Penicillium türleri ise *Aspergillusların* aksine düşük sıcaklıklarda toksin oluşturabilme yeteneğindedirler. (Anonymous, 2006a).

2.2.1.2. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger de *A. ochraceus* gibi üzümde izole edilebilmekte ve OTA oluşturabilmektedir. Optimum gelişme sıcaklığı ise 28-30°C'dir ve OTA oluşturabilmek için 25-32°C sıcaklığa gereksim duymaktadır (Anonymous, 2006a).

A. ochraceus'un tüm izolatlarının OTA üretebilmesine karşın *A. niger* nadiren ve düşük konsantrasyonda OTA ürettiği saptanmıştır (Accensi, 2004).

2.2.1.3 *Penicillium verrucosum*

Penicillium verrucosum 5-10 °C sıcaklıkta okratoksin üretebilmektedir. -2 °C de bile gelişimlerini yavaş da olsa sürdürebilmektedir. Kanada, İskandinav ülkeleri gibi soğuk-serin kuşakta yetiştirilen ürünlerdeki OTA'dan sorumlu küf olarak *Penicillium verrucosum* gösterilmektedir. *Penicillium verrucosum*' un minimum su aktivite değerleri de oldukça düşüktür ($A_S = 0.79$; 0.80-0.81) (Anonymous, 2006a).

2.2.1.4 *Penicillium citrinum*

Penicillium citrinum, sitrinin oluşturmakla birlikte düşük sıcaklıklarda OTA da sentezlemektedir (Şahin ve Korukluoğlu, 2000). Daha çok tahıllarda bulunmakta, meyve suları ve üzümde izole edilebilmektedir. Üzümlerde nadiren ve düşük konsantrasyonlarda OTA oluşturabilmektedir (Anonymous, 2006a).

2.3. Yaş ve Kuru Üzümlerden Küf İzolasyonu İle İlgili Yapılan Çalışmalar

OTA üreten küfler, meyvelerin patojen mikroorganizmalar tarafından enfekte olması veya fiziksel/kimyasal herhangi bir etkiyle zarar görmesi durumunda meyvelerde kolaylıkla gelişebilmekte ve sorun yaratmaktadırlar. OTA'nın özellikle üzüm, üzüm suyu ve şaraplarda sorun yarattığı bildirilmiştir (Delage ve ark., 2002). Üzümler, hasat öncesi, hasat sırasında veya üzümlerin işlenmesi aşamasında çeşitli küf türleri tarafından kontamine olabilmektedir. Üzümlerin özellikle *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternia*, *Uncinula* ve *Plasmopara* cinsi küfler tarafından saldırıya uğradığı belirtilmektedir (Magnoli ve ark., 2003).

Battilani ve Pietri (2002), üzümlerde ve şarapta OTA varlığının belirlenmesine yönelik yaptıkları diğer bir çalışmada üzümlerde OTA varlığı ve

miktarının sıcaklık, yağmur ve nispi nem gibi iklim faktörlerine, üzümün olgunluğuna ve kalitesine göre değişiklik gösterebildiğini bildirmişlerdir.

Sage ve ark. (2004), Fransa'daki üzüm bağlarının mikroflorasını ve buradaki OTA riskini araştırdıkları çalışmada *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerini izole ettiklerini, Fransa'nın güneyinden, daha çok *Aspergillus* türlerinin, kuzey kısımlarından ise *Penicillium* türlerinin izole edildiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda tüm üzümlerden izole edilen *Aspergillus carbonarius*'un OTA sentezlediğini de saptamışlardır.

Battilani ve ark. (2004), *A. carbonarius* kolonileşmesinin ve OTA miktarının farklı üzüm çeşitlerine göre farklı olduğunu saptamışlar ve kabuk kalınlığının da OTA kontaminasyonunu etkilediğini belirtmişlerdir.

Bae ve ark. (2004), üzüm ve üzüm ürünlerinde OTA miktarını düşürmek için, Lufox (Luferunon ve fenoxycab içeren carbomate tipi böcek ilacı), Decis (delthametrin içeren pyrethroid böcek ilacı) gibi çeşitli böcek ilaçlarının kullanımının yanısıra Bt'yi (*Bacillus thuringiensis*) de çalışmalarına dahil etmişler ve sonuçların oldukça başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Merrien (2003), ise üzümde yaptığı bir çalışmada *Bacillus thuringiensis*'in OTA üreten fungusların büyümesini engellediğini göstermiştir (Bae ve ark. (2004)).

Varga ve Kozakiewicz (2006), OTA kontaminasyonu açısından üzümlerin sağlamlığının birincil önemli nokta olduğunu vurgulamış ve çürümüş veya hasarlı olan tanelerin sağlıklı tanelere göre daha fazla OTA ($0,20 - 1,40\mu\text{gkg}^{-1}$) içerdiğini saptamışlardır. Üzümdeki hasara, üzüm güvesi ve diğer böceklerin larvaları ile fungal patojenler ve aşırı sulama veya yağmur darbelerinin sebep olabileceği; Fransa'da yapılan araştırmalarda üzüm güvesinin larvasının (eudemis ve cochylis türleri) OTA üreten fungusları etkilediği belirtilmiş ve üzümdeki OTA konsantrasyonunun miktarı ve larvaların sebep olduğu deliklerin sayısı arasında sıkı bir ilişki gözlemlendiği bildirilmiştir.

Varga ve Kozakiewicz (2006), üzümlerde ve üzüm ürünlerinde OTA'nın belirlenmesine yönelik yaptıkları bir çalışmada, üzümlerde fungal kolonileşmeyi etkileyen birçok faktörün olduğunu ve iklimsel koşulların bunda belirli etkilerinin olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan araştırmalarda üzümlerdeki OTA

kontaminasyonunun aynı üzüm bağında yıldan yıla çeşitlilik gösterdiği, üzüm bağının bulunduğu bölgenin çok önemli olduğu belirtilmiştir. Akdeniz'e özgü havzalarda daha fazla olduğu, OTA'nın, Fransa, Yunanistan ve İtalya'nın kuzey kısımları ile Portekiz ve İspanya'nın belirli bölgelerinde de tespit edildiğini bildirmişlerdir. Yine Varga ve Kozakiewicz (2006), yakın zamanlardaki bir çalışmada Portekiz'in sıcak ve kuru yaz karakteri olan kuzey bölümlerinde yer alan, üzüm bağlarından okratoksin üreten *Aspergillus* türü küfler izole edildiğini, yaz boyunca sıcaklığın ılık geçtiği Portekiz'in güney bölgelerinde yer alan üzüm bağlarından ise okratoksin üreten *Aspergillus* türlerinin çok zor izole edildiğini belirtmişlerdir. Benzer olarak OTA üreten *Aspergillus* türleri sadece Macaristan'ın kuzey bölgelerinden izole edilmiştir. Avustralya'daki üzüm bağlarında OTA üreten *Aspergillus* türlerinin ana kaynağının toprak olduğunu tespit etmişlerdir. *Aspergillus* türlerinin az sürülmüş (işlenmiş) olan üzüm bağlarının topraklarına karşı, sürülmüş topraktan daha sık izole edilebildiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra, küf sayımının asmaların altındaki toprakta asma sıralarının arasında bulunan topraktan daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir.

2.4. Yaş Üzümde OTA Varlığı ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Aspergillus ve *Penicillium* türleri tarafından oluşturulan OTA insan ve hayvan sağlığı üzerinde yarattığı risk nedeniyle dünyada giderek dikkat çekmekte ve son yıllarda tahıl ve domuz etinin yanı sıra üzüm, üzüm suyu, şarap, bira, kahve ve sütte de bulunduğu bildirilmektedir (Abarca ve ark., 2001).

OTA'nın ilk olarak Zimmerli ve Dick (1995) tarafından şarapta tespit edildiği bundan sonrada, diğer üzüm türevi ürünlerde tespit edildiği bildirilmiştir (Varga ve Kozakiewicz, 2006). Magnoli ve ark. (2003), OTA'nın üzümlerde ve şaraplarda bulunması ile ilgili olarak elde edilen verilerin genelde Almanya, Fransa, İskandinav ve Balkan ülkeleri kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir.

Zimmerli ve Dick (1996), küflenmiş üzümün kullanılması sonucu küf ile kontamine olmuş ekipmanların üzümün üretilen ürünle (üzüm suyu, şarap) temas

etmesi veya iyi üretim tekniklerine uyulmaması sonucu ürünlerde OTA kontaminasyonunun söz konusu olabildiğini bildirmişlerdir.

Cabanes ve ark. (2002), *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından oluşturulan OTA'nın oluşumunda iklim koşullarının etkili olduğunu ve üzümün okratoksin kontaminasyonun tarlada gerçekleştiğini ve yaptıkları bir çalışmada İspanya'dan temin edilen tüm şaraplık üzümlerden OTA üreten *Aspergillus carbonarius* izole ettiklerini ve *Aspergillus carbonarius*'un, üzümlerde ve şaraplarda OTA oluşumuna neden olan en önemli küf türü olduğunu bildirmektedirler.

Delage ve ark. (2002) üzümde pestisit kullanımının, üzümün hasat edilme ve depolama koşullarının, OTA miktarında etkili olduğunu saptamışlardır.

Magnoli ve ark. (2003), üzümlerde; küf kontaminasyonunda ve mikotoksin oluşumunda, hasattan önce, hasat sırasında ve üretim aşamasında sıcaklık ve nemin önemli bir faktör olduğunu vurgulamışlardır. Üzümlerde en önemli mikotoksinlerin *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin ürettiği OTA, aflatoksin ve sitrinin olduğunu da belirtmişlerdir.

Eltem ve ark (2003) yaptıkları araştırmada Ege bölgesinden toplanan 52 yaş üzüm örneğinden 37'sinde OTA'ya rastlanmazken, 15 örnekte (oransal olarak %28.8) 0.24-1.5 ppb arasında değişen miktarlarda OTA bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, taze meyvelerde hasat sonrası bozulmaların başlıca sorumlusu olarak belirtilen siyah sporlu küflerin Ege Bölgesi'nin çekirdeksiz üzümlerinde hem hasat öncesi hem de hasat sonrası içeren bütün safhalarda aynı yoğunlukta bulunduğunu belirtmişlerdir.

Serra ve ark. (2003), şaraplık üzümlerde 0,05'ten 37 μgkg^{-1} a kadar değişen değerlerde OTA tespit etmiş ve OTA üretiminden sorumlu küfün *A. carbonarius* ve *A. niger* olduğu bildirilmiştir.

Curto ve ark. (2004), farklı miktarlardaki pestisit kullanımının, üzümlerde ve bu üzümlerden üretilen şaraplarda, OTA miktarının azaltılmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir .

Sage ve ark. (2004), Fransa'daki üzüm bağlarından iki ayrı dönemde temin edilen üzümlerden 0,01 ile 1,90 $\mu\text{g g}^{-1}$ aralığında oldukça düşük değerlerde OTA tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Cozzy ve ark. (2006), İtalya’da şaraplık üzümlerde *Lobesia botrana*’nın OTA kontaminasyonunu üzerine etkisini araştırmış ve 0,02 ng/g’den 681 ng/g’a kadar değişen değerlerde OTA saptamışlardır. *L. botrana*’nın zarar verdiği üzümlerin daha fazla OTA içerdiğini belirtmişlerdir.

2.5. Kuru Üzümde OTA Varlığı ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Markakı 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 olmadıkları araştırılmış, örneklerin OTA miktarları kantitatif olarak tespit edildiğini belirtmiştir. Çalışmalar sonucunda OTA’yı çok sayıda küf türünün oluşturabildiğini bildirmiştir.

Eltem ve ark. (2003), kuru üzümde yaptıkları bir araştırmada, Ege bölgesindeki koşulların, kuru üzümde OTA oluşumu açısından uygun olduğunu saptamışlardır.

Battılanı ve ark. (2004), üzüm ve ürünleri arasında en yüksek OTA miktarının kuru üzümlerde ölçüldüğünü (40µg/kg’dan fazla) belirtmişlerdir. 1999 ve 2000 yıllarında İtalya’nın kuzey ve güney bölgelerinde yetiştirilen üzümlerde yapılan analizler sonucunda *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri izole edilmiş; sıcaklık, yağış ve nem farkının üzümlerde OTA oluşumu üzerinde etkili olduğunu saptamışlardır.

Akdemir ve ark. (2005), kuru üzümdeki OTA düzeyini saptamak üzere yaptıkları çalışma sonucunda OTA değerinin Avrupa Komisyon direktifinde tanımlanmış olan performans kriterlerinin (10 µgkg⁻¹) üzerinde olduğunu saptamışlardır.

2.6. ELISA Yöntemi

Gıdalarda patojen mikroorganizmaların ve toksinlerinin saptanmasında genellikle ELISA tekniği kullanılmaktadır. Tek bir antijene karşı hazırlanmış antikorların yanında birden çok antijene karşı hazırlanmış antikorların kullanımıyla ELISA tekniğinde farklı tür ve suşların saptanması mümkün olabilmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

2.6.1. OTA Varlığının ELISA Yöntemi ile Saptanması

Mikotoksin analizinde kullanılan geleneksel kromatografik analiz yöntemleri kesin sayısal sonuç vermelerine rağmen, uzun süreli, yüksek maliyetli ve karmaşık prosedürleri gerektirmektedir. Son yıllarda kullanılmaya başlayan ve antikor-antijen etkileşmesini esas alan immunokimyasal prosedürler ve özellikle ELISA (enzymelinked immunosorbentassay) ve RIA (radio-immunosorbentassay) testleri büyük önem kazanmıştır. Bununla birlikte, RIA testinde bir radyoizotop kullanma zorunluluğu olması, ELISA testinin önemini daha da arttırmıştır. Bu maksatla, günümüzde birçok önemli mikotoksin için spesifik antikorlar üretilmiştir. (GÜRSES ve ark., 2003)

Gıda maddelerinden, OTA ile kontamine olmuş ürünlerde toksini belirlemeye yönelik günümüzde hassas ve güvenli birçok yöntem bulunmaktadır. ELISA metodunun diğer yöntemlere göre avantajı ön işlemlerin çok azaltılmış olması, işlemin kısa sürmesi 1mgkg^{-1} mikotoksin veya altındaki miktarların saptanabilmesidir (Anonymous, 2006a; Varga ve Kozakiewicz, 2006).

Üzüm ve üzüm ürünlerinde OTA analizi yapılan araştırmalarda daha çok HPLC yöntemi kullanılmaktaysa da ELISA ile yapılmış araştırmalar da mevcuttur.

MacDonald ve ark. (1999), kuru üzüm gibi kurutulmuş meyvelerde, Belli ve ark. (2004), şarapta; Serra ve ark. (2003) şaraplık üzümde OTA'nın varlığını araştırdıkları çalışmalarda HPLC yöntemini kullanırken, Varga ve Kozakiewicz (2006), üzüm ve üzüm ürünlerinde OTA'nın varlığını araştırdıkları çalışmada HPLC

ve ELISA yöntemini karşılaştırmalı olarak kullanmışlardır. 2mgkg^{-1} düzeyinde OTA tespit edebildikleri ELISA yönteminin başarılı olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM**3.1. Materyal****3.1.1. Üzüm**

Araştırmada kullanılan üzümler Adana'da sofralık olarak tüketilen üzümlerden seçilmiş ve piyasadan temin edilen 22 yaş üzüm ve 22 kuru üzüm olmak üzere toplam 44 örnek çalışılmıştır. Yaş üzümler manav, pazar, market ve bağdan temin edilmiş; Tarsus beyazı, Antep karası, kardinal, çekirdeksiz üzüm, Yalova incisi ve siyah kuş üzümü olmak üzere 6 çeşit üzerinde çalışılmıştır. Kuru üzüm olarak 3'ü ambalajlı olmak üzere market ve pazar yerlerinde açıkta satışa sunulan sultani çeşitler örnek olarak çalışılmıştır.

Çizelge 3.1'de yaş üzüm örnekleri ve temin edildiği yerleri verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Yaş Üzüm Örnekleri ve Temin Edildiği Yerler

YAŞ ÜZÜM ÖRNEKLERİ 1. PARALEL	TEMİN YERİ	YAŞ ÜZÜM ÖRNEKLERİ 2. PARALEL	TEMİN YERİ
1. TARSUS BEYAZI	MANAV	12. TARSUS BEYAZI	PAZAR
2. ANTEP KARASI	MANAV	13. ANTEP KARASI	PAZAR
3. KARDİNAL	MANAV	14. KARDİNAL	PAZAR
4. ÇEKİRDEKSİZ ÜZÜM	MANAV	15. ÇEKİRDEKSİZ ÜZÜM	PAZAR
5. SİYAH KUŞ ÜZÜMÜ	MANAV	16. SİYAH KUŞ ÜZÜMÜ	PAZAR
6. TARSUS BEYAZI	BAĞ/CEYHAN	17. TARSUS BEYAZI	MARKET
7. ANTEP KARASI	BAĞ/CEYHAN	18. ANTEP KARASI	MARKET
8. KARDİNAL	BAĞ/CEYHAN	19. KARDİNAL	MARKET
9. ÇEKİRDEKSİZ ÜZÜM	BAĞ/CEYHAN	20. ÇEKİRDEKSİZ ÜZÜM	MARKET
10. SİYAH KUŞ ÜZÜMÜ	BAĞ/CEYHAN	21. SİYAH KUŞ ÜZÜMÜ	MARKET
11. YALOVA İNCİSİ	BAĞ/CEYHAN	22. YALOVA İNCİSİ	MARKET

3.1.2. Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

Araştırmada, küf izolasyonu amacıyla, Potato Dextrose Agar (PDA), Czapek-Doks Agar (CzA) besiyerleri kullanılmıştır. Ekstraksiyonda kullanılmak üzere %70'lik metanol ile 0,1 M fosforik asit ve dilüsyon sıvısı kullanılmıştır.

Dilüsyon Sıvısı :	NaCl (Merck)	8,5 g/l
	Pepton (Oxoid)	1,0 g/l

Yukarıdaki besiyerleri ve dilüsyon sıvısı 121°C de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

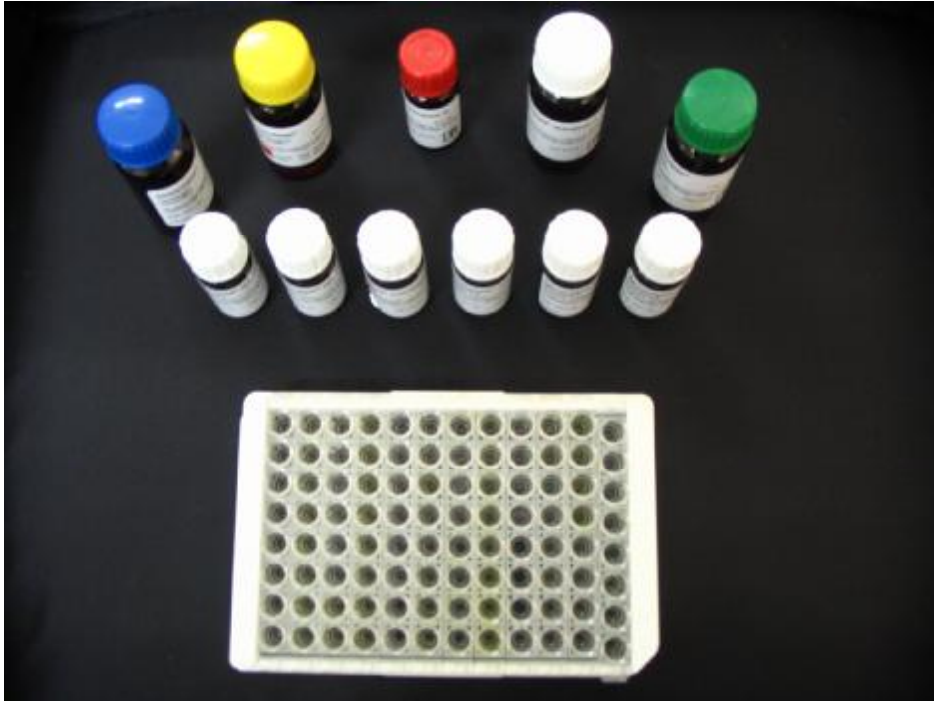
3.1.3. ELISA OTA Kiti

Yaş ve kuru üzümelerde OTA varlığını ve/veya miktarını tespit etmek amacıyla 96 örneklilik Ridascreen OTA ELISA kiti kullanılmıştır.

Resim 3.1 ve 3.2'de Ridascreen OTA ELISA Test Standartları, Substrat, Kromogen, Durdurma Çözeltileri ve Mikrotiter Plate Kuyucukları gösterilmektedir.



Resim 3.1. Ridascreen OTA ELİSA Test Kiti



Resim 3.2. Ridascreen OTA ELİSA Test Standartları, Substrat, Kromogen, Durdurma Çözeltileri ve Mikrotiter Plate Kuyucukları

3.2.Yöntem

Toplam 44 adet yaş ve kuru üzüm örneğinden, küf izolasyonu gerçekleştirilmiş ve OTA varlığı araştırılmıştır.

3.2.1. Yaş ve Kuru Üzümlerden Küf İzolasyonu

Küf sayımında ve izolasyonunda Potato Dekstroz Agar (Merck) ve Czapek Agar besiyerleri kullanılmıştır. Hazırlanan 10^{-1} lik yaş ve kuru üzüm örneklerinden gerekli seyreltme yapılarak yayma kültürel yöntemine göre ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan örnekler 25°C 'de 3-6 gün süre ile inkübasyona bırakılıp küf gelişimi sağlanmıştır. 72 saat sonunda küf gelişimi gözlenen örneklerden sayım yapılmıştır (Durlu-Özkaya ve Kuleaşan, 2000).

3.2.2. Yaş ve Kuru Üzümlerden İzole Edilen Küflerin Tanımlanması

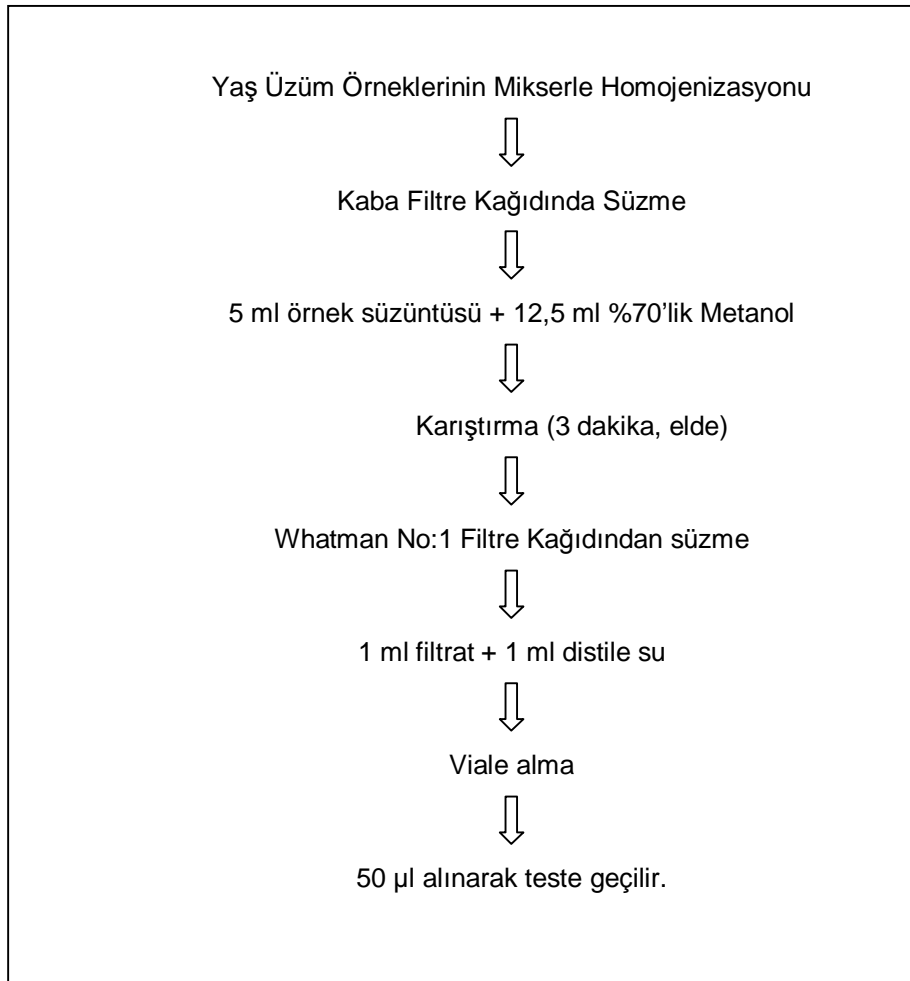
İzole edilen küflerin tanımlanmasında Potato Dextrose Agar ve Czapek Agar besiyerleri kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerine tek koloni düşürme tekniği ile ekilerek 25°C 'de 3-6 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda petri kabında gelişen küf kolonileri değerlendirilmiştir. Tanımlamalar mikroskopik olarak ve 2 farklı besiyerinde 3 nokta ekim yöntemi ile Samson ve ark., (1981) ve Onions ve ark., (1981)'e göre yapılmıştır.

3.2.3. Yaş ve Kuru Üzümlerde OTA Varlığının Araştırılması

Piyasadan temin edilen yaş ve kuru üzümler laboratuvara hemen getirilmiş ve ekstraksiyonu yapılabildiği kadar soğuk hava koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.2.3.1. Yaş Üzüm Ekstraksiyonu

Toplanan (1-2 kg) yaş üzüm örnekleri, Şekil 3.1’de de görüldüğü gibi öncelikle mikserde homojenize edilmiş ve kaba filtre kağıdından geçirilmiştir. Elde edilen süzüntüden 5 ml örnek alınarak 12,5ml %70’lik metanol ile bir blenderde 3 dakika karıştırıldıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve bir kapta toplanmıştır. Elde edilen filtrattan 1ml alınıp 1ml distile su ile sulandırılarak filtrat bir vialle alınmış ve daha sonra buradan 50µl alınarak OTA ELISA kiti test prosedürüne göre analiz edilerek 450 nm ELISA Reader’da okutularak değerler belirlenmiştir.

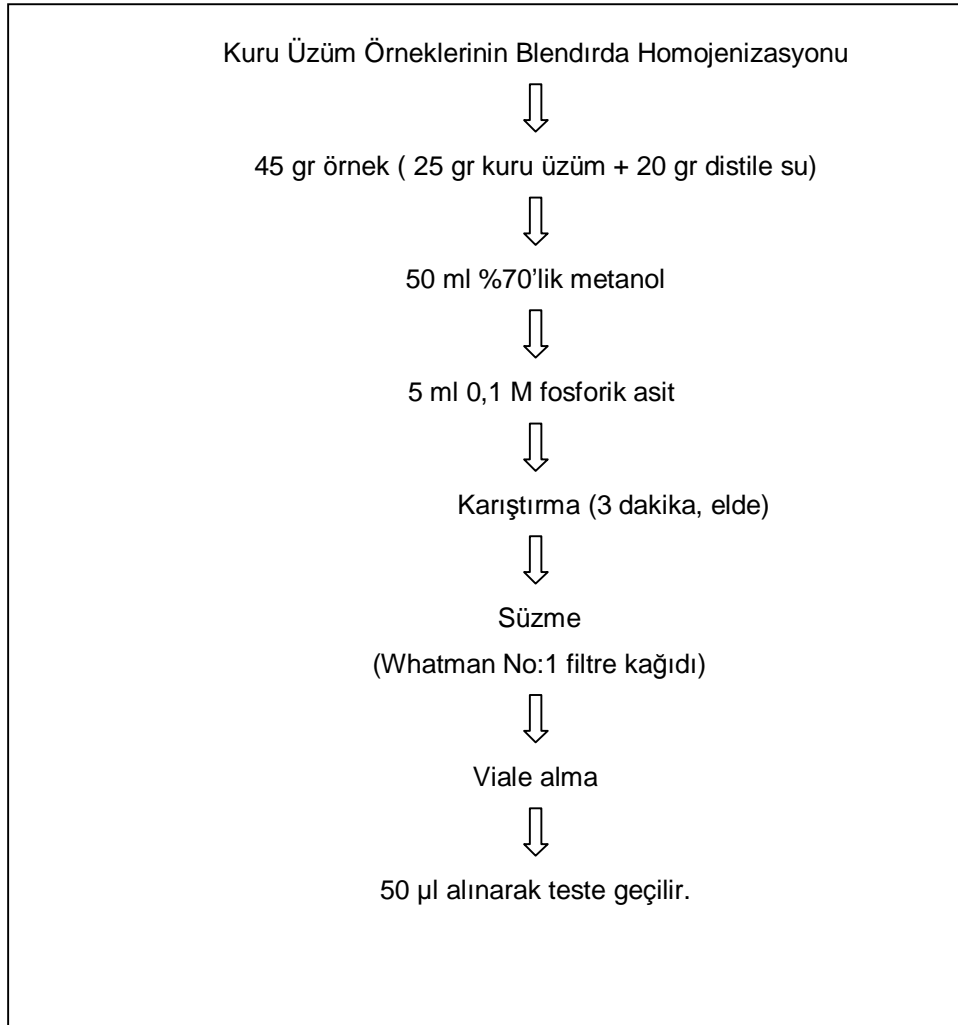


Şekil 3.1. Yaş Üzüm Ekstraksiyonu Akış Şeması

3.2.3.2. Kuru Üzüm Ekstraksiyonu

Piyasadan alınan (500 gr) kuru üzüm örnekleri blendırda iyice öğütülerek homojenize edilmiş ve 25 gr kuru üzüm örneği ile 20 gr. distile su karıştırılarak 45 gr örnek hazırlanmıştır. Bu örneğe 50 ml %70'lik metanol ve 5 ml 0,1 M fosforik asit ilave edilerek 5 dakika blendırda karıştırılmıştır. Bu karışım Whatman No:1 filtre kağıdından süzülüş ve bir kaptan toplanmıştır. Elde edilen filtrat bir vialde alınmış ve daha sonra buradan 50µl alınarak OTA ELİSA kiti test prosedürüne göre analiz edilerek 450 nm ELISA Reader'da okutularak değerler belirlenmiştir.

Şekil 3.2'de kuru üzüm ekstraksiyonu akış şeması verilmiştir.

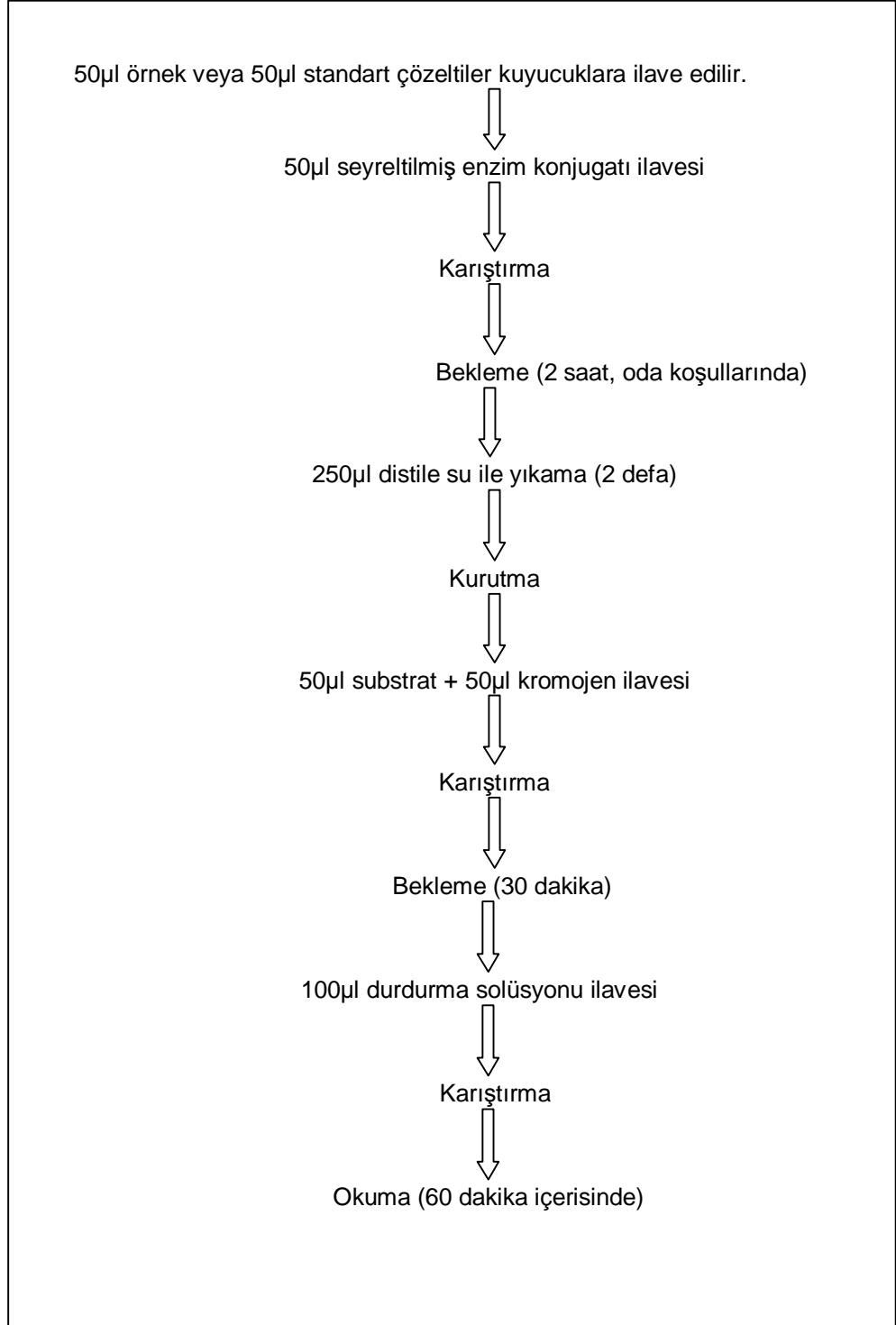


Şekil 3.2. Kuru Üzüm Ekstraksiyonu Akış Şeması

3.2.3.3. ELISA Test Prosedürü

Yaş ve kuru üzüm örneklerinde OTA varlığının araştırılmasında ELISA yöntemi kullanılarak tespit edilmesinde R-Biopharm firması tarafından üretilen test kiti prosedürü kullanılmıştır. Örneklerin ELISA test kuyucuklarına inokülasyonundan önce (1/1) seyreltme işlemi uygulanmıştır. Test kiti içerisinde bulunan OTA standartlarından 50 µl alınarak, OTA'ya spesifik antikor bulunan mikrotiter plate kuyucuklarına aşılanmış, benzer şekilde ekstrakte edilen örneklerden de 50µl alınarak kuyucuklara paralel ilave edilmiştir. Her bir kuyucuğa 50µl seyreltilmiş enzim konjugatı ilave edildikten sonra dikkatli bir şekilde karıştırılmış, 2 saat oda koşullarında (20 – 25°C) ve karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucukta bulunan sıvı ortamdaki uzaklaştırılmış ve kuyucuk 250 µl yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır. Yıkama aşamasından sonra kuyucuk iyice kurutulmuş, 50µl substrat ve 50µl kromogen çözeltisi ilave edilmiştir. Karıştırılarak 30 dakika oda koşullarında ve karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda kuyucuklara 100 µl durdurma solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur.

Test kuyucukları 60 dakika içerisinde, Titertek Multiskan Plus serisi ELISA okuyucu cihazı kullanılarak 450 nm'de absorbans değerinde okunmuştur. Yaş ve kuru üzüm örneklerindeki OTA varlığı ve miktarı R-Biopharm tarafından hazırlanan RIDAWIN.EXE paket programı kullanılarak belirlenmiştir. Hesaplamalarda dilüsyon faktörü yaş üzüm için 5, kuru üzüm için ise 3 olarak alınmıştır. Çalışmada kullanılan Ridascreeen OTA ELISA test prosedüründe tahıllar, yemler ve bira için dilüsyon faktörleri verilirken meyve ve meyve suları için herhangi bir dilüsyon faktörü verilmemiştir. Bu nedenle çalışmamızda yaş ve kuru üzüm için kullandığımız akış şemaları R-biopharm firmasına gönderilerek çalıştığımız ürünler için dilüsyon faktörleri hesap ettirilmiş ve değerlendirmelerde bu faktörler kullanılmıştır.



Şekil 3.3. ELISA Test Prosedürü Akış Şeması

3.2.3.4. Sonuçların Okunması ve Değerlendirilmesi

Yaş ve kuru üzüm örnekleri Ridascreeen OTA ELISA kiti test prosedürüne göre kuyucuklara aktarılmıştır. Test kuyucukları Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü Fitopatoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarında bulunan Titertek Multiscan Plus ELISA okuyucusunda 450 nm absorbands değerinde okutulmuş, yaş ve kuru üzüm örneklerindeki OTA varlığı ve miktarı R-Biopharm tarafından hazırlanan RIDAWIN.EXE paket programı kullanılarak belirlenmiştir.

Resim 3.3'te Titertek Multiscan Plus ELISA okuyucusu gösterilmektedir.



Resim 3.3. Titertek Multiscan Plus ELISA okuyucusu

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Araştırma kapsamında 22 yaş üzüm ve 22 kuru üzüm olmak üzere 44 örnek üzerinde çalışılmıştır. Üzüm örneklerinden küf izolasyonu yapılmış ve üzümlerdeki OTA varlığı ve düzeyleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar AB ülkelerinde ve TGK’de kabul edilen maksimum OTA limitlerine göre değerlendirilmiştir.

4.1. Yaş ve Kuru Üzümlerden Küf İzolasyonu

Yaş ve kuru üzüm örneklerinde bulunan küf sayım sonuçları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Bu araştırmada incelenen yaş ve kuru üzüm örneklerinden izole edilen küfler *Aspergillus niger* (siyah küf), *Penicillium citrinum* (yeşil küf) ve *Moniliella acetoabutens* (gri küf) olarak tanımlanmışlardır. Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’nin incelenmesiyle görülebileceği gibi 22 yaş üzüm örneğinin 20’inde (oransal olarak %90) *Aspergillus niger* (siyah küf), 8’inde (oransal olarak %36) *Penicillium citrinum* (yeşil küf) bulunmuştur. 22 kuru üzüm örneğinin 15’inde (oransal olarak %68) *Aspergillus niger* (siyah küf), 12’inde (oransal olarak %55) *Penicillium citrinum* (yeşil küf), 4’ünde (oransal olarak %18) ise *Moniliella acetoabutens* (gri küf) bulunmuştur. Sonuçlar yaş üzümlerde *Aspergillus niger* $6,0 \times 10^1 - 5,0 \times 10^4$ kob/g, *Penicillium citrinum* $4,0 \times 10^2 - 1,5 \times 10^4$ kob/g; kuru üzümlerde ise, *Aspergillus niger* $1,0 \times 10^1 - 8,3 \times 10^3$ kob/g, *Penicillium citrinum* $1,0 \times 10^1 - 1,9 \times 10^4$ kob/g, *Moniliella acetoabutens* ise $5,0 \times 10^1 - 1,5 \times 10^4$ kob/g aralığında bulunmuştur.

Resim 4.1 ile 4.2’de çalışmamızda yaş ve kuru üzümlerden izole edilen *A. niger*’in, Resim 4.3 ile 4.4’te *P. citrinum*’un, Resim 4.5 ile 4.6’da ise *Moniliella acetoabutens*’in petri kabındaki görüntüleri gösterilmektedir.

Cabanes ve ark. (2002), şarapta OTA’nın kaynağının araştırıldığı çalışmada İspanya’dan temin edilen tüm üzümlerden *Aspergillus carbonarius* ve *Penicillium purpuregenum* izole etmişlerdir. Buna karşın, Abrunhosa ve ark (2001) Portekiz’de şarap üretiminde kullanılan üzümlerin küf florasını ve mikotoksin varlığını

araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, şarap yapımında kullanılan üzümlerden OTA üretme yeteneğine sahip olan küf suşlarına rastlayamamışlardır.

Battilani ve Pietri. (2002), 1999 ve 2000 yıllarında İtalya'nın kuzey ve güney bölgelerinde yetiştirilen üzümlerde yapılan analizler sonucunda *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerini izole etmiş; sıcaklık, yağış ve nem farkının üzümlerde OTA oluşumu üzerinde etkili olduğunu saptamışlardır.

Eltem ve ark. (2003), kuru üzümde yaptıkları bir araştırmada taze meyvelerde hasat sonrası bozulmaların başlıca sorumlusu olarak belirtilen siyah sporlu küflerin Ege Bölgesi'nin çekirdeksiz üzümlerinde hem hasat öncesi hem de hasat sonrası içeren bütün safhalarda aynı yoğunlukta bulunduğunu belirtmişlerdir.

Battilani ve ark. (2004), farklı üzüm çeşitlerinde *A. carbonarius* kolonileşmesinin farklı olduğunu belirtmiştir.

Bau ve ark. (2004), 2001 sezonunda İspanya'nın Akdeniz'e yakın bölgelerinde bulunan 7 bağdan temin edilen üzümlerin % 75.6'sında *Alternaria* spp., %22.5'inde *Cladosporium* spp. ve %17.3'ünde *Aspergillus* spp. izole etmişlerdir. Üzümlerin %2.3'ünde *Penicillium* spp. ve %0.8'inden daha düşük değerlerde *Monilia*, *Trichoderma* ve *Botrytis* izole edilmiştir. Bu çalışmada 16 tür *Penicillium* tanımlanmasına rağmen en önemli OTA üreticilerinden *Penicillium verrucosum* izole edilmemiştir. Tanımlanan türlerden %18.5'ni *P. citrinum*, %16.9'unu *P. glabrum*, % 13.8'ini ise *P. chrysogenum* oluşturmaktadır. Tanımlanan bu türlerin de OTA ürettiği bildirilmektedir. Aynı zamanda üzümlerin %16.9'unda *Aspergillus niger aggregate*, %3.6 sında ise *A. carbonarius* izole etmişlerdir.

Varga ve Kozakiewicz (2006), *A. carbonarius*'un izole edilen OTA üreticilerinin en önemlisi olduğunu bunun yanında *A. niger* ve *A. aculeatusun*'da üzümde OTA üretebildiklerini belirtmişlerdir. Bu OTA üreticilerinin asıl kaynağının toprak olduğu; tane çürümesi ve kuru üzüm küflenmesine sebep olabildiği bildirilmiştir. Almanya, Güney Macaristan, Çek Cumhuriyeti ve Fransa, İtalya ve Portekiz'in kuzey kısımları gibi soğuk hava iklimlerinin bulunduğu ülkelerde şaraplarda OTA kontaminasyonunun varlığına karşın üzüm tanelerinden *Aspergillus* türlerinin izole edilemediği, soğuk iklimlerde tarımsal üründe, daha çok *Penicillium* türlerinin OTA kontaminasyonunun sorumlusu olarak bulunduğu belirtilmiştir.

Penicillium türlerinin şarapta ve şıradaki üreme kabiliyetinin olması ve mikotoksin üretmesine rağmen, OTA üreten Penicillium türlerinin üzümde çok nadir bulunduğu bildirilmiştir. Bununla beraber Battilani ve ark (2004), Güney İtalya ve Fransa'daki üzümlerde OTA üreten Penicillium türlerini tanımlamışlardır. Bu bölgelerdeki Penicillium türlerinin üzümdeki OTA kontaminasyonunun olası sorumlusu olduğunu saptamışlardır.

Çalışmamızda, yaş üzüm örneklerimizin %90'ından, kuru üzüm örneklerimizin ise %68'inden *Aspergillus niger*, yine yaş üzüm örneklerimizin %36'sından, kuru üzüm örneklerimizin ise %55'inden *Penicillium citrinum* izole edilmiştir. OTA sentezleyebildiği bilinen *A. niger* ve *Penicillium citrinum*'un yaş ve kuru üzüm örneklerimizdeki OTA kontaminasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir. Kuru üzüm örneklerimizden *Moniliella acetoabutens*'de izole edilmiş ancak bu küfün yapılan çalışmalarda üzümde izole edilebilmesine karşın OTA üretmediği bildirilmektedir.

Çizelge 4.1. Yaş Üzümlerde Küf Sayım Sonuçları

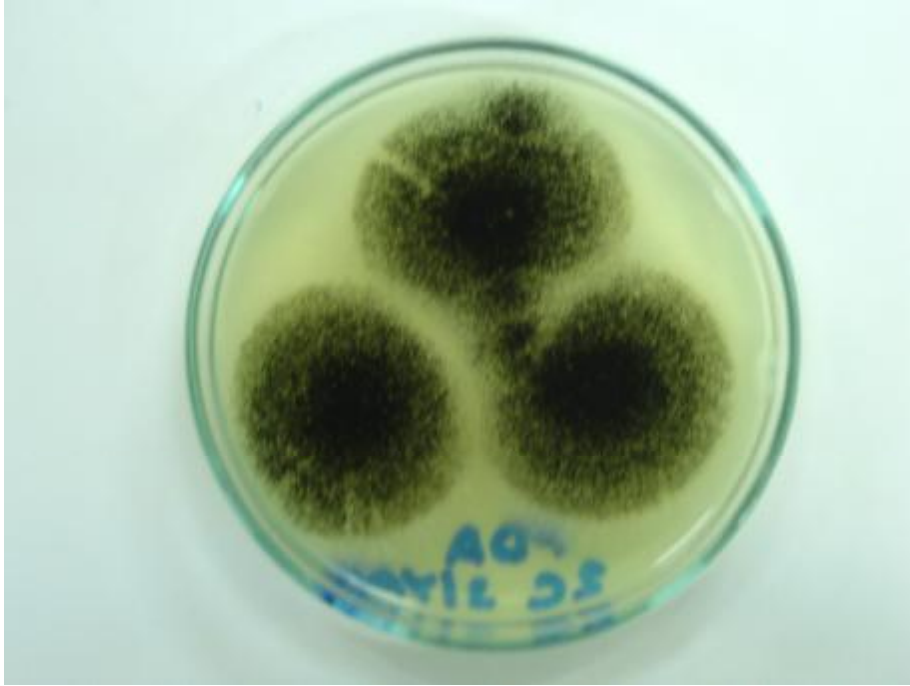
Örnek No	Kob/g (Siyah Küf)	Kob/g (Yeşil Küf)	Örnek No	Kob/g (Siyah Küf)	Kob/g (Yeşil Küf)
1. TB	*	*	12. TB	1,5x10 ³	5,0x10 ²
2. AK	1,3x10 ⁴	*	13. AK	3,4x10 ³	*
3. K	1,8x10 ⁴	*	14. K	2,6x10 ³	*
4. ÇÜ	1,0x10 ²	*	15. ÇÜ	3,4x10 ³	1,9x10 ³
5. KÜ	1,2x10 ⁴	*	16. KÜ	5,0x10 ⁴	*
6. TB	6,0x10 ¹	*	17. TB	*	5,0x10 ²
7. AK	1,5x10 ³	*	18. AK	1,5x10 ³	*
8. K	1,2x10 ⁴	4,0x10 ³	19. K	3,0x10 ²	1,5x10 ⁴
9. ÇÜ	3,5x10 ³	*	20. ÇÜ	1,5x10 ³	4,0x10 ²
10. KÜ	2,4x10 ⁴	1,8x10 ³	21. KÜ	3,4x10 ³	*
11. Yİ	1,8x10 ³	4,0x10 ²	22. Yİ	1,5x10 ³	*

TB: Tarsus Beyazı, AK: Antep Karası, K: Kardinal, ÇÜ: Çekirdeksiz Üzüm
KÜ: Kuş Üzümlü, Yİ: Yalova İncisi
(*): bulunamadı

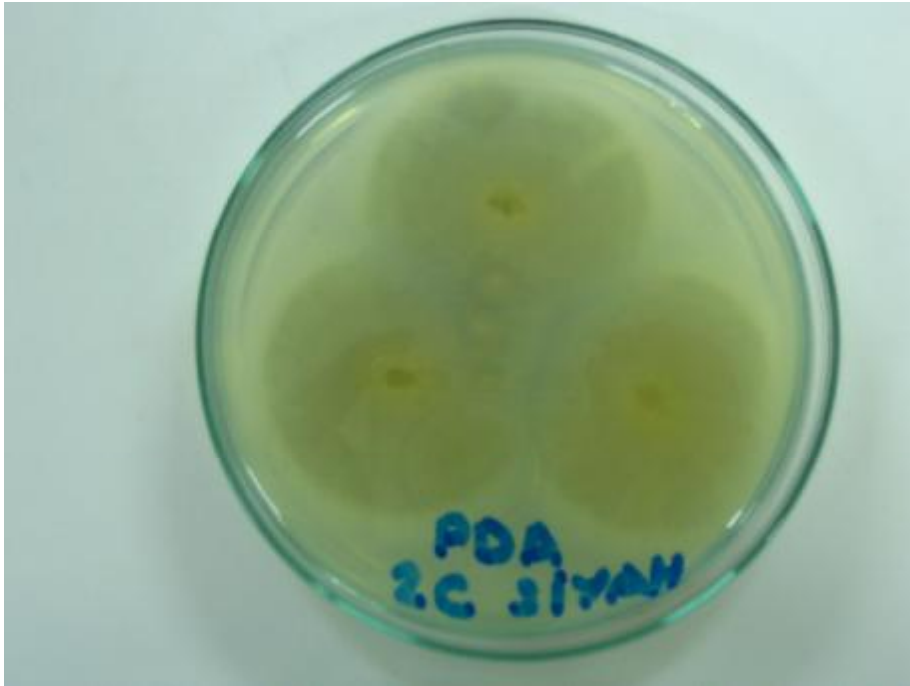
Çizelge 4.2. Kuru Üzümlerde Küf Sayım Sonuçları

Örnek No	Kob/g (Siyah Küf)	Kob/g (Yeşil Küf)	Kob/g (Gri Küf)	Örnek No	Kob/g (Siyah Küf)	Kob/g (Yeşil Küf)	Kob/g (Gri Küf)
1	*	*	*	12	$2,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	*
2	$4,0 \times 10^1$	*	*	13	$5,0 \times 10^3$	*	*
3	*	*	*	14	*	*	*
4	$3,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	*	15	$3,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	*
5	$5,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1$	*	16	$1,5 \times 10^3$	*	*
6	$8,3 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	*	17	*	*	*
7	$1,2 \times 10^2$	$5,0 \times 10^1$	*	18	$5,0 \times 10^3$	$9,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$
8	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	*	19	$3,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	*
9	$2,2 \times 10^2$	*	*	20	$3,7 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$
10	*	*	*	21	*	$1,9 \times 10^4$	$5,0 \times 10^1$
11	$2,5 \times 10^3$	*	*	22	*	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$

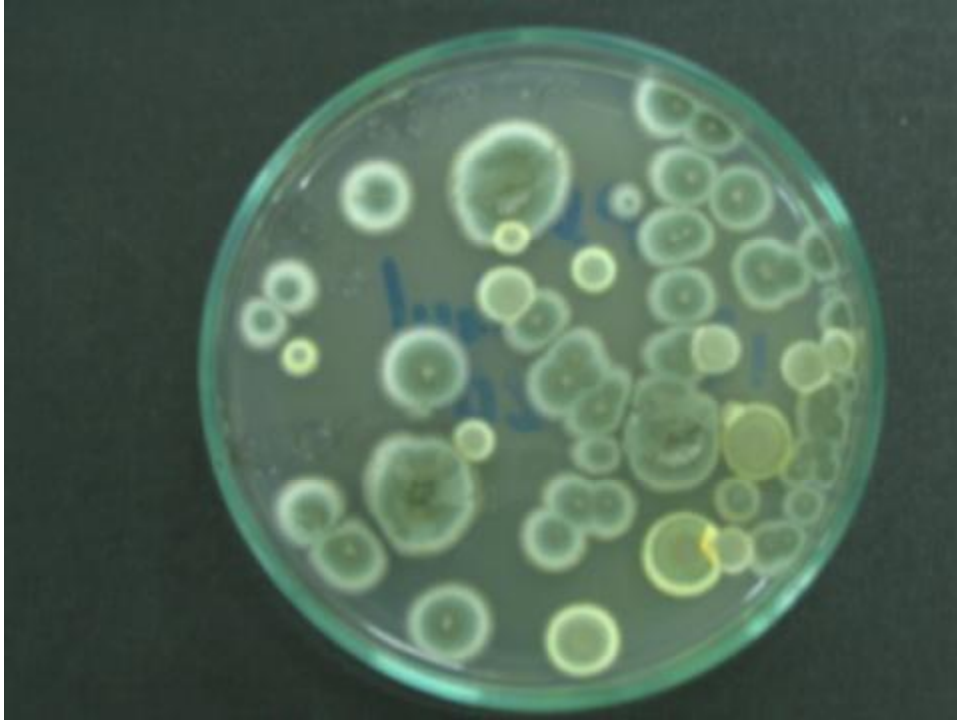
(*) bulunamadı



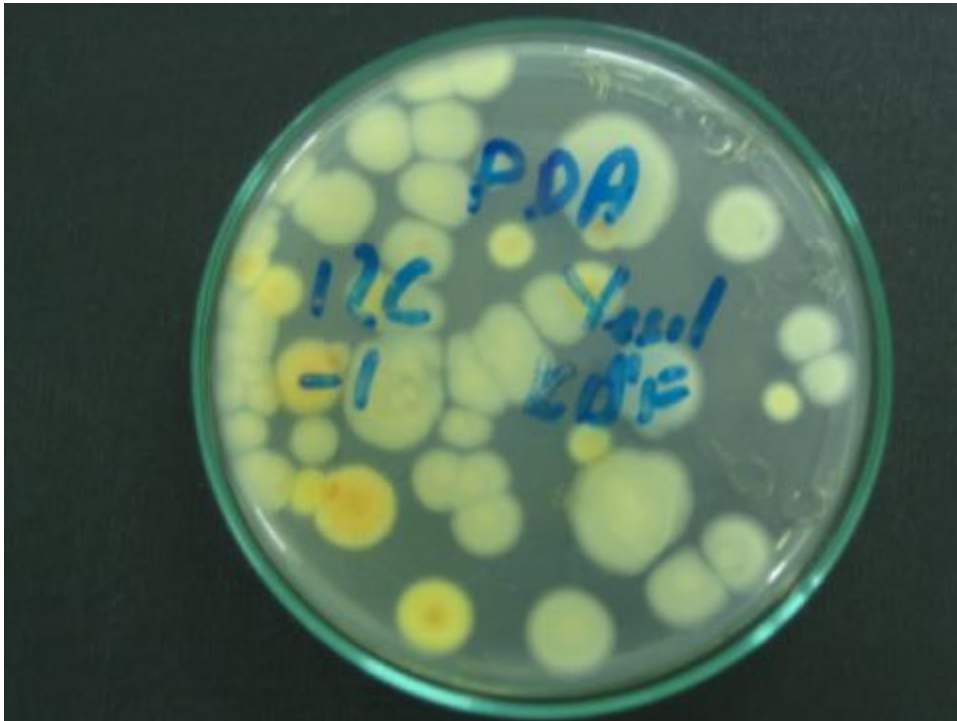
Resim 4.1. Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerinde *Aspergillus niger* kolonilerinin önden görünüşü



Resim 4.2. PDA besiyerinde *Aspergillus niger* kolonilerinin arkadan görünüşü



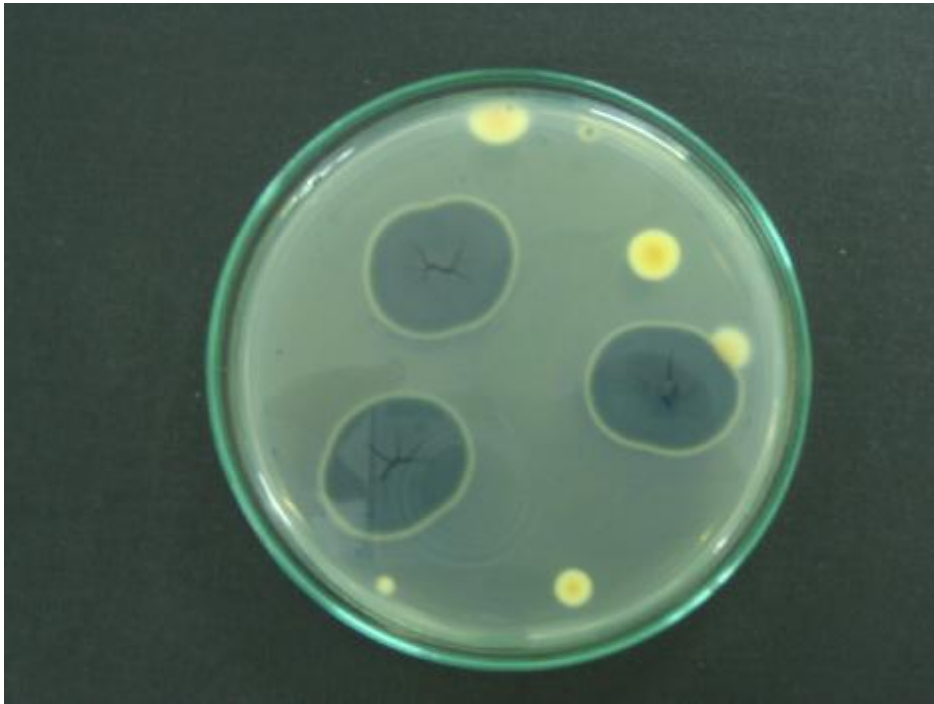
Resim 4.3. PDA besiyerinde *Penicillium citrinum* kolonilerinin önden görünüşü



Resim 4.4. PDA besiyerinde *Penicillium citrinum* kolonilerinin arkadan görünüşü



Resim 4.5. PDA besiyerinde *Moniliella acetoabutens* kolonilerinin önden görünüşü



Resim 4.6.PDA besiyerinde *Moniliella acetoabutens* kolonilerinin arkadan görünüşü

4.2. Yaş ve Kuru Üzümlerde OTA varlığı

Piyasadan, farklı yerlerden temin edilen yaş ve kuru üzüm örneklerinin ekstraksiyonu yapılarak, üzümde OTA'nın varlığı araştırılmıştır. 22 yaş üzüm ve 22 kuru üzüm olmak üzere toplam 44 farklı örnekten elde edilen OTA varlığı ve miktarı ile ilgili sonuçlar sırasıyla Çizelge 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir.

Araştırma sonuçlarına göre; hem yaş üzümde hem de kuru üzümde OTA varlığına rastlanmış ancak kuru üzümde yaş üzüme oranla daha yüksek değerlerde OTA tespit edilmiştir.

4.2.1. Yaş Üzümlerde OTA varlığı

Çizelge 4.1'in incelenmesiyle görülebileceği gibi pazar, manav, bağ ve market olmak üzere 4 farklı yerden temin edilen ve 6 farklı çeşit yaş üzüm örneği üzerinde yapılan analiz sonucunda 0.2 ile 0.7 µg/kg (ppb) aralığında değişen değerlerde OTA tespit edilmiştir. Piyasadan 4 farklı yerden temin edilen farklı çeşit yaş üzüm örneklerinde tespit edilen OTA değerleri Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Çizelge 4.2'nin incelemesiyle görülebileceği gibi yaptığımız analiz sonucunda farklı çeşit üzümde OTA miktarı birbirine yakın düzeylerde tespit edilmiştir. Bu değerler; Tarsus beyazında 0.3 µg/kg, Antep karasında 0.4 µg/kg, Kardinalde 0.5 µg/kg, Çekirdeksiz üzümde 0.5 µg/kg, Kuş üzümünde 0.5 µg/kg, Yalova incisinde ise 0.4 µg/kg olarak belirlenmiştir.

Avrupa Birliği'nde üzüm suyu ve şarapta maksimum OTA miktarının 2 µg l⁻¹ olarak kabul edildiği ayrıca Finlandiya ve İngiltere gibi bazı ülkelerin kendi OTA limitlerini 0.5 µg l⁻¹ olarak belirlediği bildirilmektedir (Varga ve ark., 2006). Yapılan araştırmalarda yaş üzümde herhangi bir limit belirtilmemiştir. Araştırmamızda elde ettiğimiz bulguların Avrupa Birliğince kabul edilen, üzüm suyunda izin verilen maksimum OTA düzeyini aşmadığı görülmüştür. En yüksek OTA düzeyi 0.7 µg/kg olarak marketten temin edilen Antep karası çeşidine ait (18 nolu örnek) yaş üzüm örneği ile bağdan temin edilen Kardinal çeşidine ait (8 nolu örnek) yaş üzüm örneği olmuştur. Ceyhanda bulunan bir bağdan temin edilen

Kardinal cinsine ait (8 nolu örnek) yaş üzüm örneğinde en yüksek OTA miktarı (0.7 ppb) tespit edilmesine rağmen manavdan temin edilen yine aynı cinse ait yaş üzüm örneğimizde (2 nolu örnek) OTA'ya rastlanmamıştır.

Araştırma kapsamında bağ, manav, pazar ve marketten temin edilen yaş üzüm örneklerinin OTA düzeyleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılığın üzümün cinsine ve temin yerine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Battilani ve Pietri (2002), üzümlerde OTA varlığı ve miktarının sıcaklık, yağmur ve nispi nem gibi iklim faktörlerine, üzümün olgunluğuna, kabuk kalınlığına ve kalitesine göre değişiklik gösterebildiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Magnoli ve ark. (2003) üzümlerde; küf kontaminasyonunda ve mikotoksin oluşumunda, hasattan önce, hasat sırasında ve üretim aşamasında sıcaklık ve nemin önemli bir faktör olduğu vurgulamışlardır. Delage ve ark. (2002), üzümde pestisit kullanımının, üzümün hasat edilme ve depolama koşullarının OTA miktarında etkili olduğunu saptamıştır.

Cabanes ve ark. (2002), üzümün okratoksin ile kontaminasyonun tarlada gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Eltem ve ark. (2003), kuru üzümlerde OTA'nın hangi aşamada meydana geldiğini tespit etmek amacıyla Ege bölgesinden toplanan 52 yaş üzüm örneği üzerinde çalışmış bu örneklerin 37'sinde OTA'ya rastlanmazken, 15 örnekte (oransal olarak % 28.8) 0.24–1.5 ppb arasında değişen miktarlarda OTA bulunduğunu bildirmişlerdir.

Belli ve ark. (2004), kırmızı ve beyaz üzümlerden elde edilen üzüm suyunda yaptıkları çalışmada, üzüm suyunun 0.01 – 4.7 $\mu\text{g l}^{-1}$ aralığında değişen değerlerde OTA içerdiğini tespit etmiş aynı zamanda kırmızı üzümlerin %86'sının, beyaz üzümlerin ise %17'sinin OTA içerdiğini belirtmişlerdir. OTA miktarının üzümün orjinine ve rengine bağlı olarak değişebileceğini ancak yaptıkları çalışmanın buna tam olarak cevap veremeyeceğini bildirmişlerdir.

Varga ve Kozakiewicz (2006), çürümüş veya hasarlı olan tanelerin sağlıklı tanelere göre daha fazla miktarda OTA içerdiğini belirtmişlerdir. 15 Avrupa ülkesinden temin edilen beyaz ve kırmızı şarap örneklerinde OTA varlığını araştırmışlar ve İtalya'da üretilen şaraplarda en yüksek OTA miktarını (1.30 ng/kg)

saptamışlardır. Fungal kolonileşmede ve OTA miktarında üzüm bağıının bulunduğu bölgenin çok önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Çizelge 4.3. Yaş Üzüm Örneklerindeki OTA Düzeyleri

ÖRNEK NO	OTA DÜZEYİ (µg/kg)	ÖRNEK NO	OTA DÜZEYİ (µg/kg)
1. TB	0.2	12. TB	0.3
2. AK	*	13. AK	0.3
3. K	0.3	14. K	0.4
4. ÇÜ	0.4	15. ÇÜ	0.6
5. KÜ	0.5	16. KÜ	0.6
6. TB	0.4	17. TB	0.4
7. AK	0.3	18. AK	0.7
8. K	0.7	19. K	0.5
9. ÇÜ	0.5	20. ÇÜ	0.4
10. KÜ	0.4	21. KÜ	0.4
11. Yİ	0.4	22. Yİ	0.5

TB: Tarsus Beyazı, AK: Antep Karası, K: Kardinal, ÇÜ: Çekirdeksiz Üzüm
KÜ: Kuş Üzüümü, Yİ: Yalova İncisi
(*): bulunamadı

Çizelge 4.4. Farklı Üzüm Çeşitlerinde OTA düzeyleri

ÜZÜM ÇEŞİDİ	OTA DÜZEYİ (µg/kg)
TARSUS BEYAZI	0.3
ANTEP KARASI	0.4
KARDİNAL	0.5
ÇEKİRDEKSİZ ÜZÜM	0.5
SİYAH KUŞ ÜZÜMÜ	0.5
YALOVA İNCİSİ	0.4

4.2.2. Kuru Üzümlerde OTA varlığı

Çizelge 4.5'in incelenmesiyle görülebileceği gibi piyasadan 22 farklı yerden temin edilen sultani çeşit kuru üzüm örneği üzerinde yapılan analiz sonucunda 5.1 ile 18.2 µg/kg (ppb) aralığında değişen değerlerde OTA tespit edilmiştir.

Avrupa Birliği ülkelerinde kuru üzümde kabul edilebilir maksimum OTA miktarının 10 µg/kg olarak belirlendiği bildirilmektedir (Varga ve ark., 2006; Sabancı, 2002). Türk Gıda Kodeksinde de kuru üzümde kabul edilebilir maksimum OTA miktarı 10 µg/kg olarak belirlenmiştir (TGK, 2002). Araştırmamızda elde ettiğimiz bulguların bir çoğunun Türk Gıda Kodeksinde kabul edilen, maksimum OTA limitini aştığı görülmektedir. 22 örnekten 13'ünün (oransal olarak ~ %60) 10 µg/kg limitinin üzerinde OTA içerdiği; 9 örneğin ise (oransal olarak ~ %40) bu limitin altında değişen oranlarda OTA içerdiği tespit edilmiştir.

Markakı 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 bildirmişleridir.

Battilani ve Pietri (2002), üzüm ve ürünleri arasında en yüksek OTA miktarının kuru üzümde ölçüldüğünü (40µg/kg'dan fazla) belirtmiştir.

Eltem ve ark. (2003), kuru üzümde yaptıkları bir araştırmada, Ege bölgesindeki koşulların, kuru üzümde OTA oluşumu açısından uygun olduğunu saptamışlardır.

Altındışli (2003), kuru üzüm üretiminde OTA'nın iyi tarım uygulamalarıyla engellenebileceğini belirtmiş ve güvenli kuru üzüm üretiminin ilk basamağının bağda başlayan önlemler yani "Bağcılıkta İyi Tarım Uygulamaları" olduğunu bildirmiştir. Budama, toprak işleme, sulama, hormon uygulaması, bitki koruma önlemleri, hasat, kurutma ve depolama aşamalarında uygun koşulların sağlanması durumunda güvenli kuru üzüm üretiminin sağlanabileceğini belirtmektedir. Kuru üzümün nem düzeyinin %12-13, su aktivitesinin 0,4 Aw olması gerektiği; depolama yapılacak yerin sıcaklığının 5-10°C ve %65 nem koşullarını içermesi gerektiğini bildirmektedir.

Akdemir ve ark. (2005), kuru üzümdeki OTA düzeyini saptamak üzere çalışmalar yapmış, bu çalışmalar sonucunda OTA değerinin Avrupa Komisyon direktifinde tanımlanmış olan performans kriterlerinin ($10 \mu\text{gkg}^{-1}$) üzerinde olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda kuru üzüm örneklerimizin hepsinde farklı oranlarda OTA tespit edilmiş ve büyük oranının maksimum limiti aştığı görülmüştür. Çalışılan ürünlerde tespit edilen bu OTA düzeyinin, kuru üzümün kurutma, depolama, ambalajlama, nakliye ve satışa sunulan noktalardaki aşamalarda, uygun koşullara sahip olunmamasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.5. Kuru Üzüm Örneklerindeki OTA Düzeyleri

ÖRNEK NO	OTA DÜZEYİ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ÖRNEK NO	OTA DÜZEYİ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	6.2	12	16.1*
2	5.3	13	14.6*
3	18.2*	14	7.5
4	17.9*	15	15.4*
5	16.1*	16	14.6*
6	12.4*	17	5.1
7	9.8	18	5.1
8	12.9*	19	11.3*
9	14.4*	20	8.9
10	7.5	21	9.8
11	15.4*	22	11*

*TGK'da kabul edilebilir maksimum OTA limitinin üzerinde olan örnekler

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaş ve kuru üzümde daha önce yapılan çalışmalarda, farklı bölgelerde yetişen ve farklı üzüm çeşitlerinde farklı düzeylerde OTA saptanabildiği bildirilmiştir. Bu nedenle bölgemizden temin edilen yaş ve kuru üzümde küf izolasyonu ve OTA'nın varlığının araştırıldığı çalışmamızda 22 yaş ve 22 kuru üzüm örneğinden *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* ve *Moniliella acetoabutens* izole edilmiştir. Yaş üzüm örneklerinin %90'ında, kuru üzüm örneklerinin ise %68'inde *Aspergillus niger*; yine yaş üzümün %36'sında, kuru üzümün ise %55'inde *Penicillium citrinum*; aynı zamanda kuru üzümün %18'inde *Moniliella acetoabutens* izole edilmiştir. Sonuçlar yaş üzümde siyah küf $6,0 \times 10^1 - 5,0 \times 10^4$ kob/g, yeşil küf $4,0 \times 10^2 - 1,5 \times 10^4$ kob/g; kuru üzümde, siyah küf $1,0 \times 10^1 - 8,3 \times 10^3$ kob/g, yeşil küf $1,0 \times 10^1 - 1,9 \times 10^4$ kob/g, gri küf ise $5,0 \times 10^1 - 1,5 \times 10^4$ kob/g aralığında bulunmuştur.

Pazar, manav, bağ ve market olmak üzere 4 farklı yerden temin edilen ve 6 farklı çeşit yaş üzüm örneği üzerinde yapılan analiz sonucunda 0.2 ile 0.7 µg/kg aralığında değişen değerlerde OTA tespit edilmiştir. Türk Gıda Kodeksinde yaş üzüm veya üzüm suyunda OTA miktarıyla ilgili bir limit bulunmaması nedeniyle yaş üzüm analiz sonuçlarımız üzüm suyunda Avrupa Birliği Komisyonunca belirlenen OTA limitine göre değerlendirilmiştir. Bu değerlerin Avrupa Birliğince kabul edilen, üzüm suyunda izin verilen maksimum OTA düzeyini ($2 \mu\text{g l}^{-1}$) aşmadığı görülmüştür.

22 farklı yerden temin edilen sultani çeşit kuru üzüm örneği üzerinde yapılan analiz sonucunda 5.1 ile 18.2 µg/kg (ppb) aralığında değişen değerlerde OTA tespit edilmiştir. Araştırmamızda elde ettiğimiz bulguların bir çoğunun Türk Gıda Kodeksinde belirtilen maksimum OTA limitini (10 µg/kg) aştığı görülmektedir. 22 örnekten 13'ünün (orsal olarak ~ %60) 10 µg/kg limitinin üzerinde OTA içerdiği; 9 örneğin ise (orsal olarak ~ %40) bu limitin altında değişen oranlarda OTA içerdiği tespit edilmiştir.

Üzümde OTA varlığı ve miktarının sıcaklık, yağmur ve nispi nem gibi iklim faktörlerine, üzümün olgunluğuna, kabuk kalınlığına ve kalitesine göre değişiklik gösterebildiği; küf kontaminasyonunda ve mikotoksin oluşumunda,

hasattan önce, hasat sırasında ve üretim aşamasında sıcaklık ve nemin önemli bir faktör olduğu, depolama koşullarının da OTA miktarında etkili olduğu bilinmektedir.

Özellikle kuru üzümün satış koşulları ve bekleme sürelerinin OTA miktarının artışında etkili olduğu da düşünülmektedir. Kuru üzümdeki kuru madde miktarının yaş üzüme göre daha fazla olması, kurutma ve depolama koşulları kuru üzümdeki OTA kontaminasyonunun daha yüksek olmasında etkili bulunmaktadır. Çalışmamızda kuru üzüm örneklerimizin %60'ında maksimum limitin üzerinde OTA'ya rastlanırken, yaş üzüm örneklerimizdeki OTA miktarı maksimum limiti aşmamıştır.

OTA'yı oluşturan potansiyel okratoksijenik küflerin ana kaynağının toprak olduğu belirtilmiştir. Topraktaki fungusların üzüm tanelerine ulaşmasını azaltabilmek için sulamaların ben düşme döneminden sonra azaltılması böylece tozu havaya kaldıracak olan toprak işçiliğinden kaçınılması, üzüm tanelerinde fungus girişini sağlayacak çatlama ve yüzey zedelenmelerini azaltmak amacıyla bitki koruma önlemlerinin çok dikkatli yerine getirilmesi, hasat sırasında hasarlı ve küflü salkımların hasat edilmemesi, sergide üzümlerin kalın tabaka oluşturmayacak şekilde ve taneleri zedelemeyen serilmesi gibi kültürel tedbirler üretim aşamasında bağda başlayan OTA oluşumunu engellemede önemli etkenlerdir. Bu tedbirlerin "İyi Tarım Uygulamaları -GAP)" olarak ele alınması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Ürünlerde bulunan OTA varlığının azaltılması ya da giderilmesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik detoksifikasyon yöntemleri uygulanmaktadır. Hasat sırasında veya depolama aşamasında hasar gören tanelerin ayırımı, yıkama ve yabancı maddelerin uzaklaştırılması, şekil ve renk farklılıkları ve diğer sınıflandırmalar, boyut küçültme ve belirgin küf üremesi görülen tanelerin ortamdan uzaklaştırılmasıyla uygulanan fiziksel ayırım metodları mikotoksin kontaminasyonunu azaltmada bir yere kadar etkin olabilmektedir. Solventlerle ekstraksiyonu içeren kimyasal yöntemlere Avrupa Birliğince gıda maddelerine uygulanmasında yasal olarak izin verilmemektedir. Son zamanlarda mikotoksin detoksifikasyonu için biyolojik yöntemler önerilmekte fakat bu yöntemlerin de henüz araştırma aşamasında olması alternatif yöntemlere yönelme ihtiyacını doğurmaktadır.

KAYNAKLAR

- ABARCA, L. M.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; CABANES, F.J., 2001. Current Importance of Ochratoxin A-Producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*. 64(6), p: 903-906.
- ABRUNHOSA; L., PATERSEN; R.R., KOZAKIEWIC; Z.,LİMA; N., VENANCİO, A., 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 32:240-242
- ACCENSI, F.; ABARCA, L. M.; CABANES, F.J., 2004. Occurrence of *Aspergillus* Species in Mixed Feeds and Component Raw Material and Their Ability to Produce Ochratoxin A. *Food Microbiology*. 21:623-627.
- AKDEMİR, Ç.; ÖZKAYA, Ş.; BAŞARAN, A.; AKŞAHİN,İ.; KAYMAK, T.; TOPUZ, F.; ERGÜL, M. ATAK, M.; ZABE, N., 2005. Çekirdeksiz Kuru Üzüm Numunelerinde Ochratoxin A Analiz Yöntemi Geliştirilmesi ve Yöntemin Validasyon Çalışması. 2.Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Bildiriler Kitabı. (Editörler: D. HEPERKAN; F. K. GÜLER; G. D. KAYA) 23-24 Mayıs, İstanbul, s.109-115
- AKSOY, U., SABIR, E., ELTEM, R., KIRAÇ, S., SARIGÜL, N., MEYVECI, B. K., ATEŞ, M., 2003. Kuru İncirlerde OTA'nın Potansiyel Kontaminasyon Riskinin Araştırılması. *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*. (Editörler: D. HEPERKAN; G. DALKILIÇ; H. ŞENYUVA) 18-19 Eylül, İstanbul s.41- 46.
- ALTINDIŞLI, A., 2003. Kuru Üzüm Üretiminde OTA'nın Engellenmesine Yönelik İyi Tarım Uygulamaları. *Mikotoksinler Biyoteknolojisi; Sorunlar ve Çözümler çalıştay*, (Editörler: R. ELTEM; U. AKSOY; K.B. MEYVACI) 17-20 Haziran, İzmir. s. 85-91.
- ANONYMOUS, 2006a. Funguslar ve Mikotoksinler. Online: <http://www.mikrobiyoloji.org>
- ANONYMOUS, 2006b. Uluslar arası mikotoksin kanunları. Online: <http://www.sincer.com.tr>

- ANONYMOUS, 2006c. Scientific Committee on plants, European Commission.
Online: [http:// www.sincer.com.tr](http://www.sincer.com.tr)
- ANONYMOUS, 2006d. Maksimum Limits for Ochratoxin A, European Commission-Online:http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/ochratoxin_en.htm
- ANONYMOUS, 2006e. Gıdalarda Bulunması Gereken Maksimum Mikotoksin Değerleri, Online: http://www.kkgm.gov.tr/gıda_kodeksi
- ARDA, M., 1997. Temel Mikrobiyoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, 498s.
- AŞKUN, T., 2003. Gıdalarda Bulunan Bazı Mikotoksinler ve Önemi. Mikotoksinler Biyoteknolojisi Sorunlar ve Çözümler Çalıştayı. (Editörler: R. ELTEM; U.AKSOY; K. B. MEYVACI) 17-20 Haziran, İzmir, 10-17s.
- BAE, S.; FLEET,G.H.; HEARD, G.M. (2004). Occurrence and Significance of *Bacillus thuringiensis* on Vine Grapes. International Journal of Food Microbiology, 94, 301-312.
- BATTILANI, P.; PIETRI, A., 2002. Ochratoxin A in Grapes and Wine. European Journal of Plant Pathology. 1008: 639-643.
- BATTILANI, P.; PIETRI, A.; LOGRIECO, A., (2004). Risk Assesment and Management in Practice: Ochratoxin in Grapes and Wine. Mycotoxins in Food: Dedection and Control p:244-261
- BAU, M., BRAGULAT, M.R., ABARCA, M.L., MINGUEZ, S., CABANES, F.J., 2004. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. International Journal of Food Microbiology, 98:125-130.
- BELLI, N.; PARDO, E.; MARİN, S.; FARRE, G.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; 2004. Occurence of Ochratoxin A and Toxicogenic Potential of Fungal Isolates from Spanish Grapes, Journal of the Science of Food and Agriculture, 84:541-546.
- BOZOĞLU, F., 2003. Mikotoksinlerin Oluşum Mekanizması.Ulusal Mikotoksin Kongresi, Sempozyumu. (Editörler: D. HEPERKAN; G. DALKILIÇ; H. ŞENYUVA) 18-19 Eylül, İstanbul. s 17-22.

- CABANES, F. J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L., 2002. What Is The Source of Ochratoxin A in Wine. *International Journal of Food Microbiology*. 79:213-215.
- COZZI, G.; PASCALE, G.; PERRONE, G.; VÍSCONTÌ, A.; LOGRIECO, A., 2006. Effect of *Lobesia botrana* Damages on Black Aspergilli Rot and Ochratoxin A Content in Grapes. *International Journal of Food Microbiology*. p:1-5
- CURTO, R. L.; PELLICANO, T.; VILASI, F.; MUNAFO, P.; DUGO, G., 2004. Ochratoxin A Occurrence in Experimental Wines in Relationship With Different Pesticide Treatments on Grapes. *Food Chemistry*. 84:71- 75
- DELAGE, N.; D'HARLINGUE, A.; COLONNA CECCALDI, B.; BOMPEIX, G.; 2002. Occurrence of Mycotoxins in Fruit Juices and Wine. *Food Control*. 14: 225-227
- DEACON, J. W., 1997. *Modern Mycology*. Blackwell Science, Oxford p:303
- DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J.; 1997. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington D.C.
- DURLU-ÖZKAYA, F.; KULEAŞAN, H., 2000. *Maya ve Küf. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Genişletilmiş, 2. baskı, Ankara, 522s.
- ELTEM, R.; AKSOY, U.; ALTINDİŞLİ, A.; SARIGÜL, N.; TAŞKIN, E.; AŞKUN, T.; ATEŞ, M.; MEYVACI, B.; ARASILER, Z.; TURGUT, H.; KARTAL, N., 2003. Ege Bölgesinde Çekirdeksiz Kuru Üzümlerde OTA Oluşumunun Belirlenmesi. *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*. (Editörler: D. HEPERKAN; G. DALKILIÇ; H. ŞENYUVA) 18-19 Eylül, İstanbul s.54-59.
- GÜRSES, M.; ERDOĞAN, A., 2003. Önemli Bazı Mikotoksinler ve Gıdalarda Bulunmasına İzin Verilen Maksimum Düzeyleri. *Ulusal Mikotoksin Kongresi*, (Editörler: D. HEPERKAN; G. DALKILIÇ; H. ŞENYUVA) 18-19 Eylül, İstanbul. s.197

- HEPERKAN, D. 2003. Gıdalarda Mikotoksinler ve Ülkemiz Açısından Önemi. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu. (Editörler: D. HEPERKAN; G. DALKILIÇ; H. ŞENYUVA) 18-19 Eylül, İstanbul s.1-6.
- HEPERKAN, D. 2005. Mikotoksinlerin Önemi ve Türkiye’de Mikotoksin Çalışmaları. 2.Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Bildiriler Kitabı. (Editörler: D. HEPERKAN; F. K. GÜLER; G. D. KAYA) 23-24 Mayıs, İstanbul, s.3-11.
- KABAK, B., 2002. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*’un *Aspergillus flavus* gelişimi ve aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁ üzerine etkisinin in vitro şartlarda araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana, 88s.
- KABAK, B.; VAR, I., 2006. Meyve Suyu ve Şaraplarda Mikotoksin Varlığı. Dünya Gıda. Kasım, s.73-79
- MAGNOLI, C.; VIOLANTE, M.; COMBINA, M.; PALACIO, G.; 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.; DRAGACCÍ, 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
- MacDONALD, S.; WILSON, P.; BARNES, K.; DAMANT, A.; MASSEY, R.; MORTBY, E.; SHEPHERD, M. J., 1999. Ochratoxin A in Dried Vine Fruit: Method Development and Survey. Food Additives and Contaminants. 16(6):253-260
- MELLO; MacDONALD, 1997. Mycotoxins Animal Feed science and Technology. 69, p:155-166
- ONIONS, A. H. S.; ALLSHOP, D.; EGGINS, H. O. W., 1981. Smith’s Introduction to Industrial Mycology. 7. Edition, Edward Arnold Publishers Ltd. London. 398p

- ÖZKAYA, Ş.; TAYDAŞ, E. E.; BAŞARAN, A.; AVCI, B.; HIZLI, S., 1999. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı Aflatoksin Analiz Kurs Notları, 7-14 Ağustos, Ankara.
- ÖZKAYA, Ş.; BAŞARAN A.; TOPUZ F.; AKDEMİR, Ç.; 2003. Türkiye’de Üretilen Sütlerde Aflatoksin M₁ Aranması. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu. (Editörler: D. HEPERKAN; G. DALKILIÇ; H. ŞENYUVA) 18-19 Eylül 2003, İstanbul. s.93-98.
- SABANCI, R., 2003. Mikotoksinlerle ilgili Türkiye ve AB Ülkelerindeki Yasal Düzenlemeler. Mikotoksinler Biyoteknolojisi; Sorunlar ve Çözümler Çalıştayı. (Editörler: R. ELTEM; U. AKSOY; K.B. MEYVACI) 17-20 Haziran, İzmir s.105-109.
- SAGE, L.; GARON, D; MURANDI, S. F., 2004. Fungal Microflora and Ochratoxin A Risk in French Vineyards. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 5764-5768
- SAMSON, A.R.; HOEKSYRA, E.S.; OORSCHOT, C.A.N., 1981. Introduction to Food Borne Fungi. Centraalburau vor Schimmelcultures, Baarn. 247p
- SERRA, R.; MENDONÇA, C.; ABRUNHOSA, L.; PIETRI, A.; VENANCIO, A., 2003. Determination of Ochratoxin A in Wine Grapes: Comparison of Extraction Procedures and Method Validation. Analytica Chimica Acta.
- SOUFLEROS, H. E.; TRICARD, C.; BOULOUMPASI, E., 2003. Occurrence of Ochratoxin A in Greek Wines. Journal of the Science of Food and Agriculture. 83: 173-179
- ŞAHİN, İ.; KORUKLUOĞLU, M., 2000. Küf-Gıda-İnsan. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı, Bursa. 115s.
- TEMİZ, A., 1994. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. 1. Baskı, Şafak Matbaacılık, Ankara. 266s.
- TGK, 2002. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ, Tebliğ No:2002/63
(<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2002-63.html>)

- TOPAL, R. Ş., 2003. Türkiye'nin Tarımsal Ürün ve Bölgelerine Göre Dominant Mikroflora Dağılımları ve Mikotoksin Profilleri. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu. (Editörler: D. HEPERKAN; G. DALKILIÇ; H. ŞENYUVA) 18-19 Eylül, İstanbul. s.111-115
- ÜNLÜTÜRK, A.; TURANTAŞ, F., 1998. Gıda mikrobiyolojisi. 1. Baskı, Mengi Tan Basımevi, İzmir. 605s.
- VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z., 2006. Ochratoxin A in Grapes and Grape-Derived Products. Trends in Food Science & Technology. p:72-81
- ZIMMERLI, B.; DICK, R., 1996. Ochratoxin A in Table Wine and Grape-juice: Occurrence and Risk Assessment. Food Additives and Contaminants, 13, 655-658

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Adana'da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladıktan sonra 1997 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimime başladım. 2002 yılında Mezun olduktan sonra 2002 güz yarıyılında yüksek lisans programına başladım. 1 yıl Yemekçilik ve Catering hizmeti veren bir firmada çalıştıktan sonra 2005 Mayıs ayında Yönetim Sistemleri Danışmanlık hizmeti veren bir firmada Danışman olarak işe başladım ve halen bu işte çalışmaktayım.