

**KÜKÜRTDİOKSİT VE pH'NİN OKRATOKSİN A
STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SULPHUR
DIOXIDE AND pH ON THE STABILITY OF OCHRATOXIN A**

SÜREYYA ÖZCAN

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2008

KÜKÜRTDİOKSİT VE pH'NİN OKRATOKSİN A STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Süreyya ÖZCAN

ÖZ

Okratoksin A (OTA) çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir ve genellikle su içeriği yüksek gıdaların doğru kurutulmaması sonucunda depolama sırasında oluşur. OTA'nın canlılar üzerindeki toksik etkileri nedeniyle gıda ürünlerinde teknolojinin elverdiği ölçüde oluşumunun önlenmesi ve düzeyinin azaltılması önemli bir konudur. Diğer kurutulmuş meyvelerin aksine OTA düzeyi kuru üzümde daha azdır. Bunun nedeninin, üzümlerin geleneksel yöntemlerle kurutulması sırasında bir ön işlem olarak uygulanan bazik çözeltiye daldırma olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, OTA stabilitesi üzerine bazik muamele ve SO₂ etkisinin incelenmesidir. Bu doğrultuda pH 4 ile 12 arasındaki tampon çözeltilerde OTA stabilitesi incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda pH 10 ve altındaki pH'larda OTA bozunması gözlenmezken, pH 10'nun üzerinde OTA bozunmaya başlamaktadır. OTA bozunması 1. derece kinetik eğilim göstermektedir. İyon çeşidi ve konsantrasyonun da OTA stabilitesi üzerine etki ettiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmada, üzüm kurutma prosesi sırasında kullanılan potasyum karbonat ve sodyum karbonatın OTA stabilitesi üzerine etkisi araştırılmış ve daha yaygın olarak kullanılan potasyum karbonatın sodyum karbonatdan daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada kükürtdioksitin, OTA stabilitesi üzerine belirgin bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca OTA'nın bozunma ürünleri üzerine de araştırmalar yapılmış ve bozunmanın güçlü baz etkisi sonucu OTA 'da bulunan amit bağının hidrolizi şeklinde oluştuğu belirlenmiştir. OTA hidrolizi sonucu daha, az toksik olan okratoksin alfa (OT-α) ve fenilalanin oluştuğu deneysel olarak gösterilmiştir. Bu strateji *Aspergillus ochraceus* ile kontamine edilmiş üzümlere uygulanmıştır. %5 ve %8 potasyum karbonat ile muamele sonucu yaklaşık 15 saniye içerisinde OTA miktarının %43.2 ile %50.0 oranında azaldığı görülmektedir.

Anahtar kelimeler : Okratoksin A, bozunma, kuru üzüm, stabilite, okratoksin- α

Danışman: Prof. Dr. Vural GÖKMEN, Hacetepe Üniv, Gıda Mühendisliği Bölümü

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SULPHUR DIOXIDE AND pH ON THE STABILITY OF OCHRATOXIN A

Süreyya ÖZCAN

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by molds of different species of *Aspergillus* and *Penicillium*. It commonly occurs during the storage in high water content products which are not dried in a correct way. Because of the fact that these products are toxic on living things, it is generally accepted that OTA levels in food products need to be reduced as low as technologically possible. Unlike other dried fruits, occurrence of OTA in raisins has been found relatively low. Thus, lower levels of OTA could be attributed to its poor alkaline stability because raisins are traditionally processed by means of sun drying after alkaline pretreatment.

The aim of this study is the investigation of the stability of OTA over a pH range of 4.0 and 12.0 against alkaline treatment and sulphur dioxide. No OTA degradation was determined at pH value of 10.0 or less, but OTA started to decompose at pH values exceeding 10.0. The degradation of OTA followed a first order kinetic pattern. In this study the effect of potassium carbonate and sodium carbonate on the stability of OTA was determined. The type and concentration of ions were also found to affect OTA stability. Potassium carbonate which is commonly used in pretreatment was found more effective than sodium carbonate on the degradation of OTA. The results showed that sulphur dioxide has no effect on OTA. Moreover, the degradation products were identified. The effect of strong alkaline conditions was determined to be due to the hydrolysis of amide bond of OTA to release non-toxic ochratoxin- α (OT- α) and phenylalanine (Phe). This strategy was tested by using grapes contaminated with *Aspergillus ochraceus*. It was shown that OTA levels of grapes were decreased by a ratio of 43.2% and 50.0%, respectively, after dipping them into 5% and 8% of potassium carbonate solutions for 15 seconds.

Key words : Ochratoxin A, degradation, raisin, stability, ochratoxin- α

Advisor : Prof. Dr Vural GÖKMEN, Hacettepe Üniv, Food Engineering Department

TEŞEKKÜR

Tez konusu seçiminde yardımcı olan, tecrübelerini ve bilgilerini paylaşan, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Vural Gökmen'e,

Tecrübeleri ile bana her zaman yol gösteren Sayın Dr. Hamide Şenyuva ve Sayın Prof. John Gilbert'e,

Çalışmalarım boyunca her konuda bana yardımcı olan ve manevi desteğini her zaman hissettiğim arkadaşım, Burak Veli Kabasakal'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan arkadaşlarım Arda Serpen ve Savaş Bahçeci'ye,

Desteklerini her zaman hissettiğim laboratuvar arkadaşlarım Neslihan Gürel, Sebnem Öztürkoğlu Budak ve Dilek Çimen'e,

Analizlerim sırasında malzeme desteği sağlayan Sayın Edip Sincer ve R-Biopharm Rhone Ltd'ye,

Attığım her adımda arkamda olan ve daima yanımda olduklarını hissettiğim sevgili aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Süreyya ÖZCAN

Ocak 2008

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mikotoksinler.....	3
2.2. Mikotoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	4
2.3. Bazı Önemli Mikotoksin Çeşitleri	5
2.4. Okratoksinler	7
2.4.1. Tanımı ve yapısı.....	7
2.4.2. Kimyasal özellikleri.....	9
2.4.3. Okratoksin ile kontamine olabilen gıdalar.....	10
2.4.4 Okratoksinin canlı sağlığına etkisi (okratoksikozis).....	10
2.4.5 OTA için yasal düzenlemeler	12
2.5 Üzümde Okratoksin Sorunu.....	13
2.6 Geleneksel Kuru Üzüm Üretim Prosesi.....	14
2.6.1 Ağartılmış (Naturel) kuru üzümler.....	15
2.6.2 Ağartılmamış (Naturel) kuru üzümler.....	15
2.7 Daldırma Çözeltisi (Potas).....	15
2.8 Üzüm Kurutma Prosesi.....	16
2.8.1 Geleneksel yöntemlerle üzüm kurutmanın avantajları.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	18
3.2. Kullanılan Kimyasallar	18
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	19
3.3.1 OTA standart stok çözeltisinin hazırlanması.....	19

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devam)

	Sayfa
3.3.2 OTA çalışma çözeltisinin hazırlanması.....	19
3.3.3 Tampon çözeltilerin hazırlanması.....	19
3.3.4 %1-10 Na ₂ CO ₃ , K ₂ CO ₃ ve NaHCO ₃ çözeltilerinin hazırlanması	20
3.3.5 SO ₂ çözeltilerinin hazırlanması.....	21
3.3.6 <i>A. ochraceus</i> süspansiyon çözeltisinin hazırlanması	21
3.3.7 Daldırma çözeltilerinin hazırlanması.....	22
3.4 Deneysel yöntemler.....	22
3.4.1 OTA'nın pH ile değişimi.....	22
3.4.2 OTA'nın iyon tipi ve yükü ile değişimi.....	22
3.4.3 OTA yıkımının sıcaklığa bağımlılığının belirlenmesi.....	23
3.4.4 SO ₂ 'nin OTA üzerine etkisi.....	23
3.4.5 Okratoksin alfa'nın hazırlanması.....	23
3.4.6 Hasat sonrası prosesin yapay kontamine numunelere uygulanması.....	24
3.5 OTA analizi.....	25
3.5.1 Numune hazırlama.....	25
3.5.2 Analiz koşulları.....	25
3.5.2.1 HPLC koşulları.....	25
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	26
4.1 OTA'nın pH ile değişimi.....	26
4.2 OTA'nın iyon tipi ve konsantrasyonu ile değişimi.....	28
4.3 OTA yıkımının sıcaklığa bağımlılığının belirlenmesi.....	30
4.4 OTA stabilitesi üzerine SO ₂ etkisi.....	31
4.5 Bazik ortamda OTA bozunma mekanizması.....	32
4.6 Potasyum karbonat çözeltisine daldırma ile üzümde OTA dekontaminasyonu.....	34
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	36
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	37
7. ÖZGEÇMİŞ.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 OTA'nın kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.2 OT- α 'nın kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.3 Dünya kuru üzüm üretim payı.....	13
Şekil 2.4 Farklı şekillerde üretilmiş kuru üzüm çeşitleri.....	14
Şekil 2.5 Geleneksel üzüm kurutma prosesi.....	16
Şekil 2.6 Modern üzüm kurutma düzenekleri.....	17
Şekil 3.1 Hasat sonrası prosesin yapay kontamine numunelere Uygulanması.....	24
Şekil 4.1 OTA stabilitesi üzerine pH etkisi.....	26
Şekil 4.2 Farklı tampon model sistemlerinde OTA bozunma hız sabitleri.....	27
Şekil 4.3 İyon konsantrasyonu (a) ve İyonik şiddet (b)'in OTA bozunması üzerine etkisi	29
Şekil 4.4 0.36 M potasyum karbonat çözeltisinde OTA bozunması.....	31
Şekil 4.5 OTA stabilitesi üzerine SO ₂ etkisi.....	31
Şekil 4.6 0.36 M potasyum karbonat model çözeltisi içinde OTA'nın bozunma ürünleri (a) Başlangıç kromatogramı, (b) 60 dakika sonra OTA'nın bozunma kromatogramı , (c) 100 ng/ml OTA 'nın karboksipeptidaz enzimi ile bozunması ile elde edilen OT- α ve saf Phe.....	33
Şekil 4.7 Güçlü bazik ortamda OTA hidrolizi sonucu Ot- α ve Phe oluşum mekanizması.....	34
Şekil 4.8 Yapay olarak kontamine edilmiş üzümlere uygulanan kurutma prosesinin OTA üzerine etkisi	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Başlıca mikotoksin üreticisi küfler, ürettikleri mikotoksinler ve toksik etkileri.....	6
Çizelge 2.2 Okratoksin üreten fungusların oluşturdukları diğer mikotoksinler ve Etkileri.....	8
Çizelge 2.3 Avrupa birliği OTA limitleri.....	12
Çizelge 3.1 pH 4,7, 10, 11 ve 12 tamponlarının hazırlanması.....	20
Çizelge 3.2 %1-10 potasyum karbonat, sodyum karbonat ve sodyum bikarbonat çözeltilerinin hazırlanması.....	20
Çizelge 4.1 Farklı pH değerlerinde OTA bozunma hız sabitleri.....	27
Çizelge 4.2 %1-10 K ₂ CO ₃ ve Na ₂ CO ₃ çözeltilerinin pH değerleri.....	28

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

FAO	Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
FLD	Floresans Dedektör
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatograf
GMP	İyi Üretim Uygulamaları
IAK	İmmünoafinite kolon
JECFA	Gıda Katkıları Uzmanlar Komisyonu
LOD	Gözlenebilirlik sınırı
OTA	Okratoksin A
OT- α	Okratoksin-alfa
PBS	Fosfat tuzu tamponu
PDA	Patates-Dekstroz Agar
Phe	Fenilalanin
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
k	Hızsabiti

1. GİRİŞ

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaris*, *Claviceps* gibi küflerin sekonder metabolizması sonucu oluşan toksinlerdir. Mikotoksinlerin başlıca çeşitleri aflatoksin, okratoksin, fumonisin, zeralenon ve patulindir. Mikotoksin kontaminasyonu birçok gıdada gerçekleşebilmektedir. Mikotoksin içerdiği saptanmış bazı gıdalar, sert kabuklu yağlı-kuru meyveler (fındık, yer fıstığı vb.), kuru incir ve kuru üzüm gibi bazı kuru meyveler (Abarca et al.,2003, MacDonald et al., 1999, Ostry et al.,2002, Özay et al.,1995, Şenyuva et al.,2005), yağlı tohumlar (pamuk tohumu), özellikle mısır olmak üzere tahıllar, kakao, kahve (Pardo et al., 2004) ve baharatlar, (kırmızıbiber, karabiber, hindistan cevizi v.b.), üzüm suyu, şarap ve pekmezde de bulunduğu rapor edilmiştir (Belli et al.,2004).

OTA çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen bir toksindir. *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. niger aggregate*, *A. ochraceus*, ve *P. verrucosum* gibi bir çok mikroorganizmanın okratoksijenik olduğu rapor edilmiştir (Lund et al.,2003). OTA genellikle su içeriği yüksek gıda maddelerinin doğru kurutulmaması sonucunda küf gelişimi için ideal bir ortam yaratmasından dolayı depolama sırasında oluşur.

Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) , Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda Katkıları Uzmanlar Komisyonu (JECFA) raporlarına göre OTA, nefrotoksik, teratojenik, kanserojeniktir ayrıca bağışıklık sistemine ve sinir sistemine hasar verdiği, çocuklarda fiziksel ve zihinsel anormalliklere neden olduğu belirtilmiştir.

Son yıllarda OTA sağlık otoritelerinin dikkatini çeken bir konu olmuştur. OTA nın kimyasal yapısı klor içeren dihidrokumarin halkasına bağlı fenilalaninden oluşur. Bu yarı kumarin halkası Okratoksin alfa (OT- α) olarak bilinir ve OTA dan daha az toksik olduğu belirtilmiştir (Van der Merwe ve et al.,1965).

OTA farklı toksik etkiler göstermektedir (Marquardt et al.,1992). OTA Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından insan için muhtemel kanserojen madde olarak tanımlanmış ve grup 2B arasına kaydedilmiştir (IARC,1993).

Mikotoksinlerin gıda ve yemlerden uzaklaştırılması amacıyla birçok fiziksel ve kimyasal yöntem denenmiştir. En çok uygulanan strateji, alüminyum silikat ve aktif karbon kullanımınıdır (Huwang et al.,2001). Diğer kimyasal yöntemlerse amonyak veya hidrojen peroksit kullanımı ile okratoksinin bozunmasına yöneliktir (Chelkowsk et al.,1981, Fouler et al.,1994). Bu tekniklerden bazıları günümüzde de hala uygulanmaktadır.

Canlılar için toksik etkilerinden dolayı bir çok ülke, OTA'nın gıdalarda bulunma seviyelerine ilişkin yasal sınırlamalar getirmiştir. Kurutulmuş meyveler için (kuru üzüm, çekirdeksiz kuru üzüm ve sultana) Avrupa birliğinin 2002/27/EC sayılı direktifine göre maksimum bulunabilir limit 10 mg/kg olarak belirlenmiştir (Varga et al., 2006).

Üzüm, ülkemiz için önemli bir ekonomik kaynak olup, yaklaşık 525 bin hektar bağ alanında yılda yaklaşık 3,5 milyon ton üzüm üretimi gerçekleştirilmektedir. Ülkemizde üretilen üzümlerin yaklaşık %37'si kurutmalık olarak değerlendirilmektedir. Üretimin yaklaşık %72-76'sı ihraç edilirken, geri kalan kısmı yurt içinde tüketilmektedir. Türkiye dünyada pazar payının %12'sine sahip olup 5. sırada yer almaktadır (Taşkaya, 2003).

Meyvacı ve arkadaşları (2005) ile Aksoy ve arkadaşlarının (2007) kuru üzümde OTA üzerine yaptıkları 5 yıllık tarama sonucunda 1999-2003 yılları arasında analiz edilen örneklerin %9.3'ünde OTA belirlenmediği, % 0.6'sının sınır değeri olan 10 mg/kg'dan yüksek olduğu, %90.3'ünde ise 0.3-10 mg/kg arasında olduğu belirtilmektedir.

Gıda güvenliği açısından değerlendirilecek olduğunda, diğer önemli ihraç ürünleri olan fındık, incir, kırmızı biber gibi ürünlerde sık rastlanan yüksek düzeyde toksin içeriğinin kuru üzümde çok önemli bir probleme sebep olmadığı ve daha düşük seviyelerde bulunduğu dikkati çekmektedir.

Diğer kurutulmuş meyvelerin aksine, kuru üzümde OTA probleminin daha az olması ve toksin düzeyinin daha düşük olması, üzümlere uygulanan kurutma prosesine bağlı olabilir. Üzümler geleneksel olarak bazik bir çözeltiye daldırıldıktan sonra güneş altında kurutulur. Daldırma çözeltisi olarak adlandırılan bu çözelti %5-8 oranında potasyum karbonat ve yaklaşık % 0.4 oranında zeytinyağı içerir. Bu çözelti üzümün yüzeyinde bulunan mumsu tabakanın uzaklaştırılmasını sağlayarak üzümün kolay, hızlı kurummasını sağlamaktadır. pH'sı 11.0'in üzerinde olan bu daldırma çözeltisinin üzümlerde OTA'nın bozunmasına büyük ölçüde etki edebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, OTA stabilitesinin pH 4 ve 12 arasındaki tampon çözeltilerde, farklı iyon tipi ve konsantrasyonunda tuz çözeltilerinde, farklı sıcaklıklarda ve SO₂ etkisiyle değişiminin incelenmesidir

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaris*, *Claviceps* gibi küf türlerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan toksinlerdir. Mikotoksin terimi Yunanca'da küf anlamına gelen 'mykes' ve Latince'de toksik anlamına gelen 'toxicum' kelimesinden türetilmiştir (Tayfur ,1993,1996). Bugüne kadar 400 mikotoksin tanımlanmıştır. Sayılarının bu denli artışına mikotoksinler üzerinde yürütülen yoğun çalışmaların yanı sıra, yeni antibiyotik ve kemoterapik ajanların arandığı çeşitli laboratuvarlarda metabolitlerin mikotoksin olarak tanımlanmasının da katkısı olmuştur.

Bütün küf cins ve türleri mikotoksin üretmezler. Mikotoksin üretebilen küfler toksijenik olarak tanımlanmaktadır. Küflerin görünüşü, kokusu ve tatlarına bakılarak mikotoksin ürettiklerini söylemek olanaksızdır. Bazı gıdalar görünür küf taşımaksızın da mikotoksinleri içerebilirler (Jones et al.,1993). Bu metabolitler küflerin çoğalma evresinin sonuna doğru (tropofaz) veya durma evresinin başında (idiofaz) sentezlenmektedir. Bazı mikotoksinler endotoksin olarak misel içinde birikirken, birçoğunun miselden substrata doğru salgılandığı ve difüze olduğu görülür.

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 stabilite gösterirler.

Tarımsal ürünlerde hasattan başlayarak işleme ve depolama aşamalarında ortam koşullarına, tarım ürününün bileşimine ve su içeriğine bağlı olarak değişik küflere rastlanır. Küf kontaminasyonu sonucu, gıdaların mikotoksin açısından önemli bir risk altında bulunduğu belirlenmiştir.

2.2. Mikotoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Mikotoksinlerin insan sağlığı üzerine etkilerini belirlemek ve açıklamak, insanlar üzerinde deneyler yapılamadığı ve sonuçlar olmadığı için zordur. Farklı hayvan türleri mikotoksinlerin akut ve kronik etkilerine duyarlıdır. Bu indirekt verilere göre insanlar da duyarlı olabilirler. Hastalıkları belirlenmiş, izolasyon rapor verilerine, epidemiyolojik bulgulara göre mikotoksinlerin insanlarda hastalık yapabileceği düşünülmektedir (Wilson et al.,1984).

Mikotoksinlerin hayvanlar ve insan sağlığı üzerindeki toksik etkileri mikotoksikozis olarak tanımlanır. Mikotoksikozis primer ve sekonder mikotoksikozis olarak ikiye ayrılır (Peraica et al., 1999).

Mikotoksikozisi diyet, beslenme durumu, alınan toksin miktarı ve süre, sıcaklık, enfeksiyon ve stress durumu ile genetik özellikler etkileyebilir. Mikotoksinlerin oluşturduğu hastalıklarda, hastalık hangi mikotoksin tarafından oluşturulmuşsa o adla belirtilmektedir (Örnek: Aflatoksikozis, okratoksikozis).

İnsanlar

- 1- Kontamine besinlerin tüketilmesi
- 2- Küf sporlarının solunum yolu ile alınması, deri ve diğer doku temasları
- 3-Kontamine yemle beslenen hayvanların, yumurta ve süt gibi ürünlerine toksinlerin geçmesi sonucu dolaylı olarak

mikotoksinlere maruz kalırlar (Koshinsky et al.,1994). Mikotoksinlerin toksik belirtileri diğer birçok hastalığa benzemekte ve mikotoksikozis veya aflatoksikozis her zaman birbirinden kolaylıkla ayrılamamaktadır.

2.3 Bazı Önemli Mikotoksin Çeşitleri

Mikotoksin sentezleme yeteneği bilinen 350 civarında küf vardır. Mikotoksin üreten en önemli küfler *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria*'dır. Çizelge 2. 1' de mikotoksin üreten önemli 4 cinsin oluşturduğu başlıca mikotoksinler görülmektedir (Müller and Weber, 1996).

Her ürünün yapısına, bileşimine, içerdiği nem oranına, bulunduğu iklim koşullarına göre, ürünün üzerinde gelişen küf cinsleri, türleri, oranları, oluşturdukları mikotoksin çeşitleri ve miktarları değişir.

Çizelge 2.1. Başlıca mikotoksin üreticisi küfler, ürettikleri mikotoksinler ve toksik etkileri (Müller and Weber, 1996).

Mikotoksin	Toksini üreten fungus türleri	Memeli hayvanlara etkileri	Bulunduğu ürünler
Aflatoksin	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	hepatotoksik, kanserojen, teratojen (AFB1).	yer fıstığı, fındık vb. yem, süt, peynir
Okratoksin	<i>A. ochraceus</i> <i>P. verrucosum</i>	Nefropati, kanserojen, teratojen	Tahıllar, kurutulmuş meyveler, kakao, kahve, baharatlar
Sitrinin	<i>P.citrinum</i> , <i>A.</i> <i>terreus</i>	nefrotoksik, nörotoksik.	pirinç, arpa ve unları, fasulye
Fumonisin	<i>Fusarium moliforme</i>	kanserojen	Mısır ürünleri
Zearalenon	<i>F. graminearum</i> <i>F. lateritum</i>	Kısırlık ve üreme sistemi bozuklukları	Mısır ve çeşitli hububat
Patulin	<i>P. lateritum</i> , <i>P. patulum</i>	hepatotoksik, kanserojen Mutajen nörotoksik	Elma suyu ve işlem görmüş meyveler

Aflatoksinler, yüksek nemli ve sıcak koşullardaki tahıllar ve yağlı tohumlarda oluşmaktadır. *Aspergillus* cinsi küflerden *A.flavus* sadece B aflatoksinleri ve *A.parasiticus* türü ise hem B hem de G türü aflatoksinleri üretmektedir. Aflatoksinler toksik, bağışıklığı baskılayıcı, mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkili bileşiklerdir. Toksik ve karsinojenik etkilerini gösterdikleri başlıca hedef organ karaciğerdir.

Zearalenon, dünyanın her iklim bölgesinde bulunabilen küf cinsi olan *Fusarium* türlerinin bir metabolitidir. Bu meatabolit doğrudan bir toksin olmaktan çok hormon benzeri bir yapıya sahiptir ve bir seri östorojenik hastalıklara neden olmaktadır (Anonymus WHO, 2000).

Bir diğer önemli mikotoksin çeşidi olan Fumonisinler, *Fusarium moniliforme* ve diğer *Fusarium* türleri tarafından üretilen mikotoksinlerdir. Fumonisinlerden toksik öneme sahip olanlar fumonosin B1 ve fumonosin B2'dir (Peraica et al., 1999). Genellikle mısır ve mısır ürünlerinde sık rastlanan mikotoksinlerdir.

Yaklaşık 150 bileşeni olan trikotesenler grubunun en bilinen iki üyesi deoksinivalenol (DON) ve T-2 toksin (T-2)'dir (Marasas et al.,1984). *Fusarium graminearum* en önemli deoksinivalenol üretici küf olarak tanınır.

2.4 Okratoksinler

2.4.1 Tanımı ve yapısı

Okratoksinler *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küflerin özellikle *A. ochraceus*, *P. verrucosum* (*P. viridictum*)'un ikincil metabolitleridir. Okratoksin A, okratoksin B , okratoksin C, okratoksin α , okratoksin β başta olmak üzere bilinen 7 türevi vardır. Okratoksin metabolitleri içerisinde en toksik olanı OTA'dır. OTA ilk kez 1965 yılında laboratuvar denemeleri sırasında bulunmuştur.

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 sentezlerler (Çizelge 2.2).

Okratoksin içeren küflerin gelişme ve üreme aralıkları çok geniş olduğu için her yerde bulunabilme özelliğine sahip olup genellikle gıdalar ile hayvan yemlerinin kontaminasyonunda potansiyel risk teşkil etmektedirler.

Aspergillus türleri tarafından okratoksin üretilmesi yüksek sıcaklık ve yüksek nispi nemin sağlanması gerekliliği ile sınırlanırken *Penicillium* türleri için böyle bir sınırlama söz konusu değildir, *Penicillium* türleri 5 °C'ye kadar düşük sıcaklıkta okratoksin üretebilmektedir.

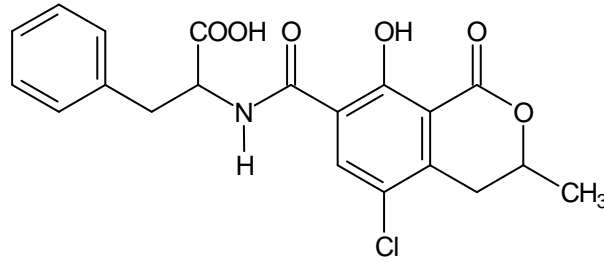
Çizelge 2.2 Okratoksin üreten fungusların oluşturdukları diğer mikotoksinler ve etkileri (Weidenbörner 1999)

OTA üretici küf türü	Mikotoksin
<i>A. alliaceus</i>	Kojikasit ¹ , penisilikasit ²
<i>A. glaucus</i> (<i>Eurotium</i> spp.)	Kojikasit
<i>A. melleus</i>	Penisilikasit
<i>A. ochraceus</i>	Penisilikasit, viomellein ² , ksantomegnin ²
<i>A. ostianus</i>	Penisilikasit
<i>A. petrakii</i>	Penisilikasit
<i>A. sclerotiorum</i>	Penisilikasit
<i>A. sulphureus</i>	Penisilikasit
<i>P. chrysogenum</i>	Patulin ³ , penisilikasit, penisilin ⁴
<i>A. puberulum</i>	Penisilikasit
<i>A. crustosum</i>	Viomellein, ksantomegnin
<i>A. aurantiogriseum</i>	Siklopiazonikasit ⁵ , patulin, sitrinin ² , penisilikasit, viomellein, ksantomegnin, rugulosin ⁶
<i>P. palitans</i>	Sitrinin, penisilikasit, penitrem A ⁷
<i>P. purpurescens</i>	Sitrinin, penitrem A
<i>P. purpurogenum</i>	Rubratoksin A, rubratoksin B2, ⁶
<i>P. variabile</i>	Patulin, rugulosin ⁸
<i>P. viridicatum</i>	Penisilikasit, sitrinin, viomellein, ksantomegnin, siklopiazonikasit, penitrem A, griseofulvin ⁹
<i>P. verrucosum</i>	Penisilikasit
1: hafif mutajen, 2: nefrotoksik, 3: hücreye toksik, 4: antibiyotik, 5: nörotoksik, 6: kanserojen, 7: tremorjen (titremeye neden olan), 8: hepatotoksik, 9: antimikotik <i>P. viridicautm</i> ve <i>P. verrucosum</i> sinonim kabul edilmemiştir.	

A. ochraceus'ün optimum gelişme sıcaklığı 28°C'dir ve 20- 30°C arasında gelişebilmektedir. Maksimum düzeyde toksini 30 °C'de % 95 bağıl nemde üretir. *Penicillium* türleri ise düşük sıcaklıkta toksin oluşturabilmektedirler. *P. verrucosum* 5-10 °C sıcaklıkta okratoksin üretebilir. Sıcak iklimlerde yetiştirilen tahıllarda OTA kontaminasyonundan sorumlu olan küf *A. ochraceus* , Kanada, İskandinav ülkeleri soğuk-serin kuşakta yetiştirilebilen tahıllarda OTA üretiminden sorumlu küfler *P. aurantiogriseum* ve *P. verrucosum*'dur. Bu iki tür -2°C'de bile gelişimlerini yavaş da olsa sürdürebilir. *A. ochraceus* kserofilik küflerdendir. Spor çimlenmesi ve gelişimi için minimum su aktivite değeri As= 0.76-0.83'tür (Akçelik ve et al.,2000).

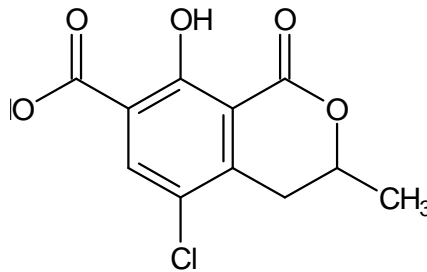
2.4.2 Kimyasal özellikleri:

OTA'nın kimyasal yapısında fenilalanin, klor ve hidroksil içeren dihidroizokumarin halkası bulunur (Şekil 2. 1). OTA'nın klor içermeyen türevi okratoksin B, etilester türevi ise okratoksin C'dir. Kumarin halkası içeren türevi OT- α olarak bilinir (Şekil 2. 2)



Şekil 2. 1. OTA'nın kimyasal yapısı

OTA, kristal yapıdadır. Ksilen ile yeniden kristalize edilebilir. Kristal formda, ultraviyole altında, asidik çözeltide yeşil ve bazik çözeltide mavi floresans verir, bu kristallerin erime noktası 169°C dir. Asit formunda olması nedeniyle polar çözücülerde (metanol, kloroform,asetonitril) ve seyreltik sodyum bikarbonatta çözünür. OTA, ışık ve havada stabil değildir. Işık ve özellikle nemli koşullara maruz kaldığı zaman bozulabilir ve etkisini kaybedebilir. Etanol çözeltisinde, karanlık ve soğukta muhafaza edildiği zaman, bir yıldan fazla stabil kalabilir.



Şekil 2.2 OT- α 'nın kimyasal yapısı

2.4.3 Okratoksin ile kontamine olabilen gıdalar

OTA çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından, genellikle su içeriği yüksek gıdaların doğru kurutulmaması sonucunda küf gelişimi için ideal bir ortam yaratmasından dolayı depolama sırasında oluşur. OTA oluşturan küflerin geniş aralıklarla canlılıklarını sürdürebilmeleri nedeniyle bir çok gıda OTA ile kontamine olabilmektedir. OTA başta arpa olmak üzere çeşitli tahıllar (Juan ve arkadaşları, 2008), (Juan et al.,2007), yefıstığı (Magnoli et al., 2007) , baklagiller, kahve (Suarez-Quiroz et al.,2004) , kakao, kırmızı biber (Almela et al., 2007; Topal 2004), bira, şarap (Battilani et al.,2006; Mateo et al.,2007,) ,üzüm, üzüm suyu (Battilani et al., 2006, Vargaa ve Kozakiewicz, 2006.), kuru incir (Şenyuva et al., 2005) ve pekmez (Arıcı et al.,2004) gibi işlem görmüş gıdaların yanı sıra ülkemizin en önemli ihraç ürünlerinden biri olan kuru üzümde (Aksoy et al.,2007, Meyvacı et al.,2005,) de bulunabilmektedir. Okratoksin B ve okratoksin C bazı gıdalarda görülmelerine karşın çok düşük miktarlarda bulunmaları sebebiyle fazla bir önem taşımazlar.

2.4.4 Okratoksinin canlı sağlığı üzerine etkisi (Okratoksikozis)

OTA'nın toksik etkileri üzerinde çalışmalar yaygın olarak çeşitli deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilmektedir. Üzerinde çalışılan bütün hayvanlar ağızdan OTA alınmasına farklı derecede duyarlılık göstermektedir. Yüksek seviyede OTA alınmasıyla böbreklerde, diğer organlarda ve dokularda değişiklikler gözlenmiştir, fakat bu toksine çevrede bulunduğu derecede maruz kalınması sadece böbrek dokularında bozukluklara neden olmuştur (Soyöz ve Özçelik, 2002).

Bir kilogram yemde 200 µg/kg kadar düşük seviyede bulunması sıçanlarda ve domuzlarda böbrek sisteminde değişikliklere neden olabilmektedir. Bilimsel açıdan OTA nefropati'ye neden olur ve genellikle bu duruma kümes hayvanlarında ve domuzlarda rastlanır. OTA farelerde, sıçanlarda ve hamsterlarda teratojeniktirler.

Okratoksin B nadir olarak doğal kontaminant olarak bulunur ve daha az toksiktir. OT- α , OTA'nın metabolizması sonucunda hidroliz sonucu ortaya çıkan bir metabolitidir. OT- α üzerine yapılan klinik incelemeler, bu maddenin toksisitesinin olmadığı yönündedir (Van der Merwe et al.,1965).

OTA'nın hedef organı böbreklerdir ve nefrotoksik özelliği nedeniyle insanlarda görülen Balkan Endemik Nefropatisinin (BEN) etmeni olduğu düşünülmektedir.

OTA'nın bir kilogram yemde 200 μ g alınmasının domuzlarda ve sığırcılarda nefropatiye neden olmasıyla OTA'nın potansiyel bir nefrotoksik olduğu bütün deneysel çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Daha düşük seviyedeki alımlar için test yapılmamıştır. Bilimsel açıdan OTA'nın çiftlik hayvanlarında nefropatiye neden olduğu uzun süredir bilinmektedir. Bu toksin birçok gıda maddesinde bulunmaktadır, yem olarak kullanılan ham maddelerde 27 mg/kg seviyesine kadar, insanlar tarafından tüketilecek gıdalarda ise 100 μ g/kg seviyesine kadar bulunabilir. Okratoksin B, OTA'dan daha az toksiktir ve karaciğer hücrelerinde protein biyosentezini inhibe etmez. OTA, dihidro-metil-izokumarin halka sisteminde C5 üzerinde klor atomuna sahiptir, bu atom okratoksin B'de bulunmaz ve klor atomuna fenolik OH eklenmesi toksisiteyi artırır.

OTA'nın akut ve kronik toksik etkisi bulunmaktadır. Akut toksisite dozu erkek ratlarda LD₅₀= 29 mg/kg , dişi ratlarda LD₅₀= 22 mg/kg'dır. Teratojenik etki genellikle civciv ve farelerde kafa bozuklukları, gaga hataları ve göz gelişiminin engellenmesi şeklinde gözlenir.

OTA Uluslararası kanser araştırma örgütü tarafından insan için muhtemel kanserojen madde olarak tanımlanmış ve grup 2B arasına kaydedilmiştir (IARC,1993).

2.4.5 OTA İçin Yasal Düzenlemeler

Toksinlerin canlı sağlığına olumsuz etkilerinin kanıtlanması sonucunda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından gıdaların toksin içeriği için limit değerler getirilmiş, tüketimde ve ihracatta belirlenen kriterlere uymak zorunlu kılınmıştır.

Ülkemizde yürürlükte olan gıdalarda bulunması gereken maksimum mikotoksin değerleri Türk Gıda Kodeksinde yer almaktadır. OTA için belirlenen limitler, İşlenmemiş tahıl taneleri (çeltik ve karabuğday dahil) için 5 ppb, tahıllardan elde edilen bütün ürünler (tahıl bazlı işlenmiş ürünler ve doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl taneleri) için 3 ppb ve kuru üzüm için 10 ppb'dir (<http://www.kkqm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2002-63.html>).

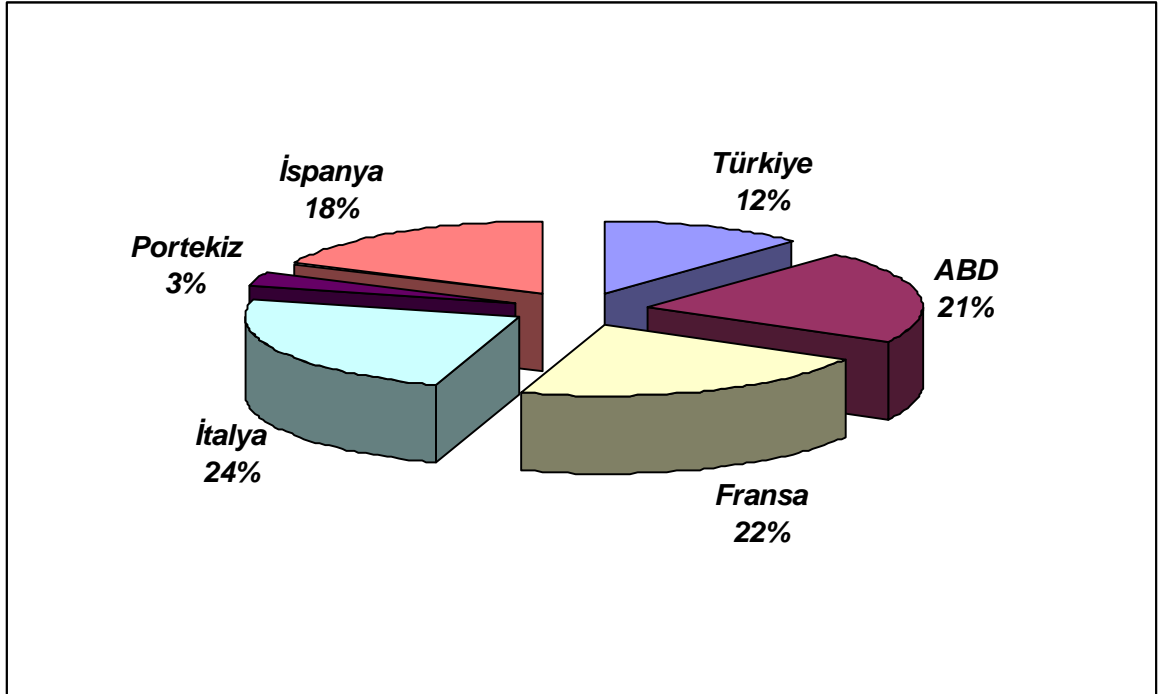
Belirlenen yasal sınırlamalar Avrupa birliği limitleri ile paralellik göstermektedir. Çizelge 2.3 'de Avrupa birliği ülkelerinin uyguladığı OTA limitleri yer almaktadır. Bu değerler özellikle ihracatta büyük önem teşkil etmekte ve sıklıkla kontrol edilmektedir (EC 123/2005).

Çizelge 2.3. Avrupa Birliği OTA limitleri (EC 123/2005).

Numune	İzin verilen Maksimum OTA miktarı (ppb)
Tahıl	5.0
Tahıl mamülleri	3.0
Şarap	1.0
Çiğ Kahve	8.0
Kurutulmuş kahve	4.0
Kurutulmuş Meyve	10.0
Bira	0.2
Üzüm suyu	0.5
Kakao	2.0
Kakao ürünleri	1.0
Baharat	10.0

2.5 Üzümde Okratoksin Sorunu

Üzüm ülkemiz için önemli bir ekonomik kaynak olup, yaklaşık 525 bin hektar bağ alanında yılda yaklaşık 3,5 milyon ton üzüm üretimi gerçekleştirilmektedir. Ülkemizde üretilen üzümlerin yaklaşık %37'si kurutmalık olarak değerlendirilmektedir. Üretimin yaklaşık %72-76'sı ihraç edilirken, geri kalan kısmı yurt içinde tüketilmektedir. Türkiye dünyada pazar payının %12'sine sahip olup 5. sırada yer almaktadır (Şekil 2.3) (Taşkaya, 2003).



Şekil 2.3. Dünya kuru üzüm üretim payı

Ülkemizde üretilen kuru üzümün yaklaşık %88'lik kısmı ihraç edilmekte olup, Türkiye kuru üzüm ihracatında uzun yıllardır 200.000 ton/yıl değeri ile dünyada ilk sırada yer almaktadır.

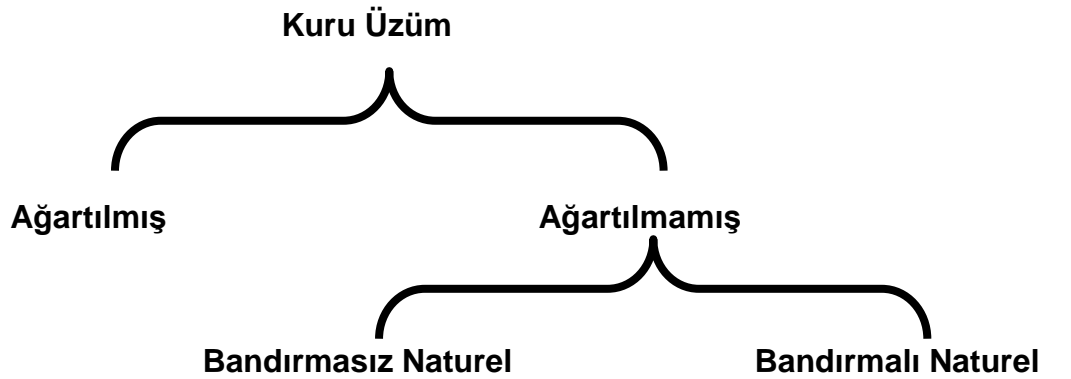
Ülkemizde yaklaşık 525 bin hektar bağ alanında yılda yaklaşık 3,5 milyon ton üzüm üretimi gerçekleştirilmektedir. Ülkemizde üretilen üzümlerin yaklaşık

- %30'u sofralık
- %37'si kurutmalık
- %30'u pekmez, pestil, sucuk, şıra
- %3'de şaraplık

olarak değerlendirilmektedir.

2.6 Geleneksel Kuru Üzüm Üretme Prosesi

Kuru üzüm temel olarak ağartılmış ve ağartılmamış olarak iki şekilde incelenebilir. Ağartılmış kuru üzümler kurutulmadan önce veya kurutulduktan sonra SO₂ ile muamele edilir. Bu muamele sırasında kullanılan SO₂ miktarı 2000 ppm düzeyini aşmamalıdır (DTM 2005/19). Ağartılmamış kuru üzümler ise Potas adı verilen potasyum karbonat ve zeytinyağı karışımından oluşturulan çözelti ile muamele edilip edilmediğine göre bandırmalı ve bandırmamasız olmak üzere kendi içinde iki kısma ayrılır (Şekil 2.4). Potasa bandırılan üzümlerin üzerinde bulunan mumsu tabaka bozularak,üzümün su tutma özelliği kaybolur ve üzüm çok daha kısa bir süre içinde kurur.



Şekil 2.4 Farklı şekillerde üretilmiş kuru üzüm çeşitleri (DTM 2005/19)

2.6.1 Ağartılmış (Naturel) Kuru üzümler

Bu üzümler kurutmadan önce veya kurutulduktan sonra SO₂ muamelesi ile ağartılır. Ağartılmış kuru üzümlerde SO₂ oranı kütlice % 0.2'den (2000 ppm) fazla olmamalıdır.

2.6.2 Ağartılmamış (Naturel) Kuru üzümler

Bandırmalı: Daldırma çözeltisi (Potas) ile muamele sonrasında kurutma yapılır. Kurutma işlemi 5-6 gün arasındadır. Bu üzümlerin rengi genellikle sarı renklidir.

Bandırmasız: Amerikan tipi direkt güneş ışığında kurutulur. Bu üzümlerin rengi mor-siyahtır ve 15-20 günde kurur.

2.7 Daldırma çözeltisi (Potas):

Daldırma çözeltisi olarak genellikle %5-8 oranında potasyum karbonat kullanılır. Uygulanan tekniğe göre, potasyum karbonat kap içinde az miktarda su ile yoğun olarak çözündürülür. İçinde su bulunan bandırma kazanına yavaş yavaş dökülür ve karıştırılır. Zaman zaman bome aemetresi (derece) ile ölçme yapılır. Eriyik 5-6 derece olunca işleme son verilir. Kullanılan suyun kireci düşük olmalıdır, aksi takdirde dipte beyaz çöküntü birikir. Bir kova içinde 100 litreye yarım litre hesabıyla zeytinyağı koyularak hazırlanır.

Daldırma çözeltisi için potasyum karbonat yerine bazı bölgelerde sodyum karbonat da kullanılabilir. Ayrıca bazı üretim hacmi az olan bazı kırsal kesimlerde küllü su olarak tabir edilen yanmış odun külü ile yapılan daldırma çözeltileri de kullanılmaktadır.

2.8 Üzüm Kurutma Prosesi

Şekil 2.5 Geleneksel üzüm kurutma prosesi



1. Sağlıklı üzüm salkımları toplanır.

2. Potas çözeltisi hazırlandıktan sonra üzüm salkımları büyük seleler içinde potas çözeltisi ile 10-15 saniye muamele edilir.



3. Süzülen üzüm salkımları güneş altında kurutulur

4. 5-6 gün sonunda kuruyan üzümler işlenmek üzere depolanır.



Kurutma işlemi eskiden toprak-saman karışımı olarak hazırlanan çamurla sıvanmış yüzeyde yapılmıştır. Günümüzde beton, kağıt veya kaneciviçeden hazırlanan sergi yerlerinde kurutulur. Son yıllarda demir konstrüksiyonlu çok katlı, çift sıralı tel veya raf sergilerde kurutma yapılmaktadır.



Şekil 2.6. Modern üzüm kurutma düzenekleri

2.8.1. Geleneksel yöntemle üzüm kurutmanın avantajları:

Geleneksel yöntemle üzüm kurutmanın sağladığı avantajlar aşağıda sıralanmıştır.

1. Çekirdeksiz üzüm taneleri üzerinde bulunan pus tabakası (mumsu tabaka)'nın yapısı bozularak tane içindeki suyu tutma özelliği kaybolur,
2. Kuruma hızlanır
3. Hızla kuruyan üzümün kabuğunda renk koyulaştırıcı polifenoloksidaz enzimi faaliyeti önlenir.
4. Lezzet ve ekonomik açıdan daha büyük önem taşıyan sarı renkte üzüm oluşur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Alet ve Cihazlar:

HPLC	: Agilent 1100 Serisi HPLC	
HPLC kolonu	: Zorbax XDB C18 (4.6mm x 100mm, 3.5 μ)	:
Hassas terazi	: Sartorius BP 2215	
pH Metre	: Mettler toledo MP220	

3.2 Kullanılan Kimyasallar ve Küf Kültürü

Metanol (HPLC Grade)	: Merck (Almanya)
Asetonitril (HPLC Grade)	: Merck (Almanya)
Benzen	: Merck (Almanya)
Ultra saf su	: Milli-Q system, Millipore (ABD)
OTA	: Acros (Belçika)
Na ₂ B ₄ O ₇ .10 H ₂ O	: Acros (Belçika)
NaOH	: Merck (Almaya)
KHP	: Merck (Almanya)
HCl	: Merck (Almanya)
KH ₂ PO ₄	: Merck (Almanya)
Na ₂ S ₂ O ₅	: Merk (Almanya)
K ₂ CO ₃	: Merck (Almanya)
Na ₂ CO ₃	: Merck (Almanya)
NaHCO ₃	: Merck (Almanya)
PBS	: Oxoid (İngiltere)
Carboxypeptidase A	: EC 3.4.17.1-Sigma type II-PMSF
<i>Aspergillus ochraceus</i>	: TUBITAK-MAM Kültür koleksiyonu-200700
Fenilalanin	: Sigma (Almanya)
PDA besiyeri	: Merck (Almanya)

3.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1 OTA standart stok çözeltisinin hazırlanması:

5 mg katı OTA 5 ml benzen:asetik asit (99:1, v:v) içinde çözülmüş ve 1000 µg/ml stok standart çözelti hazırlanmıştır. Bu çözelti Stok Çözelti 1 olarak isimlendirilmiştir.

3.3.2 OTA çalışma çözeltisinin hazırlanması:

Stok Çözelti 1'den alınan 100 µl lik kısım azot altında 40 °C'de kuruluğa kadar uçurulmuştur. Metanol ile hacmi 10 ml ye tamamlanmış ve bu çözelti Çalışma Çözeltisi 1 olarak isimlendirilmiştir.

PBS : 1 tablet 100 mL saf su içinde çözülmüştür.

2% NaHCO₃ : 20 g NaHCO₃ 1000 mL saf su içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

%20 Metanol :100 mL Metanol'ün 400 mL saf su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

HPLC hareketli fazı: Acetonitril : Su: Asetik asit (47: 71:2, v:v:v) 470 mL Asetonitril 710 mL su ve 20 mL derişik asetik asit karıştırılarak hacim 1000 mL ye tamamlanmış ve homojen bir çözelti hazırlanmıştır.

3.3.3 Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması:

Tampon çözeltiler Çizelge 3.1 de belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

0.1 M HCl : 0.414 mL %37 lik derişik HCl, 50 mL saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

0.1 M NaOH :0.020 g NaOH 50 mL saf su içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

0.2 M NaOH :0.040 g NaOH 50 mL saf su içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

0.2 M KCl :0.745 g KCl 50 mL saf su içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

0.1 M C₈H₅KO₄ :1.021 g C₈H₅KO₄ 50 mL saf su içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

0.1 M KH₂PO₄ : 0.680 g KH₂PO₄ 50 mL saf su içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

0.025M Na₂B₄O₇.10 H₂O :0.477 g Na₂B₄O₇.10 H₂O 50 mL saf su içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

0.05 M NaHPO₄ : 0.355 g NaHPO₄ 50 mL saf su içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. pH 4, 7, 10, 11 ve 12 tamponlarının hazırlanması

	pH:4	pH:7	pH:10	pH:11	pH:12
0.1 M HCl	0.1 mL				
0.1 M NaOH		29.1 mL	10.7 mL	4.1 mL	
0.2 M NaOH					12 mL
0.2 M KCl					50 mL
0.1 M C ₈ H ₅ KO ₄	50 mL				
0.1 M KH ₂ PO ₄		50 mL			
0.025MNa ₂ B ₄ O ₇ .10 H ₂ O			50 mL		
0.05 M NaHPO ₄				50 mL	

3.3.4 %1-10 Na₂CO₃, K₂CO₃ ve NaHCO₃ çözeltilerinin hazırlanması

Çözeltiler Çizelge 3.2'de belirtildiği miktarda alınarak 10 mL saf suda çözülmüştür.

Çizelge 3.2. %1-10 Na₂CO₃, K₂CO₃ ve NaHCO₃ çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

	%1	%2	%3	%4	%5	%6	%7	%8	%9	%10
	0.1gm	0.2gm	0.3gm	0.4gm	0.5gm	0.6gm	0.7gm	0.8gm	0.9gm	1.0gm
Na ₂ CO ₃	0.094M	0.188M	0.282M	0.376M	0.470M	0.564M	0.658M	0.752M	0.846M	0.940M
K ₂ CO ₃	0.072M	0.144M	0.216M	0.288M	0.360M	0.432M	0.504M	0.576M	0.648M	0.720M
NaHCO ₃	0.119M	0.238M	0.357M	0.476M	0.595M	0.714M	0.833M	0.952M	1.071M	1.190M

3.3.5. SO₂ çözeltilerinin hazırlanması

Sodyum meta bisülfid % 61.6 oranında SO₂ içermektedir (Cemeroğlu ve Acar, 1986). 1000-5000 µg/mL SO₂ çözeltileri sodyum meta bisülfid yardımıyla hazırlanmıştır.

1000 µg/mL SO₂ : 0.081 g Na₂S₂O₅, 50 mL saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

2000 µg/mL SO₂ : 0.162 g Na₂S₂O₅, 50 mL saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

3000 µg/mL SO₂ : 0.243 g Na₂S₂O₅, 50 mL saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

4000 µg/mL SO₂ : 0.324 g Na₂S₂O₅, 50 mL saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

5000 µg/mL SO₂ : 0.405 g Na₂S₂O₅, 50 mL saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.3.6 A. ochraceus spor çözeltilisinin hazırlanması

TUBITAK-MAM kültür koleksiyonundan temin edilen LY 200700 kodlu *A. ochraceus* yatık tüpteki asitlendirilmiş PDA besi yerine ekim yapılarak 28 °C'de 5-7 gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve spor oluşumu sağlanmıştır. Inkübasyon süresi sonunda her bir tüp içerisine 5 mL steril saf su (+4°C) ilave edildikten sonra öze yardımıyla sporların su içerisine geçmesi sağlanmıştır. Steril kap içerisine toplanan örnekler, steril santrifüj tüplerine alınarak 5000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonrasında süpernetant kısmı atılmış, pellet ise tekrar steril saf su ile süspanse edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Sporları yıkama işlemi bu şekilde 5 kez tekrarlanmış ve son aşamada %0.01 tween 80 çözeltisi içine alınmıştır. Elde edilen küf spor süspansiyonu, 1/100 oranında saf steril su ile seyreltildikten sonra çekirdeksiz üzümün kontamine edilmesi için kullanılmıştır (Suarez-Quiroz, 2004).

3.3.7 Daldırma Çözeltilerinin Hazırlanması

Daldırma çözeltileri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

% 5 K₂CO₃ : 25.0 g K₂CO₃ 500 mL saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

% 8 K₂CO₃ : 40.0 g K₂CO₃ 500 mL saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.4 Deneysel Yöntemler

3.4.1 OTA'nın pH ile değişimi:

OTA'nın farklı pH çözeltilerindeki stabilitesini belirlemek için Çizelge 4' de belirtildiği şekilde hazırlanan pH 4, 7,10,11 ve 12 tamponları kullanılmıştır.

OTA Çalışma çözeltisi 1'den (3.3.2) alınan 20 µL çözelti 9980 µL pH 4 tamponuyla seyreltilmiş ve 20 ng/ml OTA çözeltisi elde edilmiştir. Hazırlanan çözeltideki OTA konsantrasyonu başlangıç anından itibaren 24 saat boyunca belirli aralıklarla HPLC ile izlenmiştir.

Aynı prosedür pH 7, 10, 11 ve 12 tamponları içinde hazırlanarak başlangıç anından itibaren 24 saat boyunca belirli aralıklarla HPLC ile izlenmiştir.

3.4.2 OTA'nın iyon tipi ve yükü ile değişimi:

İyon yükünün OTA stabilitesi üzerine etkisini belirlemek için Çizelge 5'de belirtildiği şekilde hazırlanan sodyum karbonat, potasyum karbonat, ve sodyum bikarbonat çözeltileri kullanılmıştır.

OTA Çalışma çözeltisi 1'den (3.3.2) alınan 20 µL çözelti 9980 µL %1-10 Na₂CO₃ çözeltileriyle seyreltilmiş ve 20 ng/ml OTA çözeltisi elde edilmiştir. Her bir çözeltideki OTA konsantrasyonu başlangıç anından itibaren 24 saat boyunca belirli aralıklarla HPLC ile izlenmiştir.

OTA Çalışma çözeltisi 1'den (3.3.2) alınan 20 µL çözelti 9980 µL %1-10 K₂CO₃ çözeltileriyle seyreltilmiş ve 20 ng/ml OTA çözeltisi elde edilmiştir. Her bir çözeltideki OTA konsantrasyonu başlangıç anından itibaren 24 saat boyunca belirli aralıklarla HPLC ile izlenmiştir.

Çalışma çözeltisi 1'den (3.3.2) alınan 20 µL çözelti 9980 µL %1-10 NaHCO₃ çözeltileriyle seyreltilmiş ve 20 ng/ml OTA çözeltisi elde edilmiştir. Her bir çözeltideki OTA konsantrasyonu başlangıç anından itibaren 24 saat boyunca belirli aralıklarla HPLC ile izlenmiştir.

3.4.3 OTA yıkımının sıcaklığa bağımlılığının belirlenmesi:

OTA yıkımının sıcaklığa bağımlılığının belirlenmesinde üzümün hasat sonrası prosesinde genellikle kullanılan % 5 K₂CO₃ kullanılmıştır. Çalışma çözeltisi 1'den (3.3.2) alınan 20 µL çözelti 9980 µL 5 % K₂CO₃ çözeltisi ile seyreltilmiş ve 20 ng/ml OTA çözeltisi elde edilmiştir.

Elde edilen bu çözeltideki OTA konsantrasyonu 4, 25, 40 ve 60 °C'de zamana bağlı olarak HPLC ile incelenmiştir.

3.4.4 SO₂'nin OTA üzerine etkisi:

Çalışma çözeltisi 1'den (3.3.2) alınan 20 µL çözelti 9980 µL 1000 µg/ml SO₂ çözeltisi ile seyreltilmiş ve 20 ng/ml OTA çözeltisi elde edilmiştir. Hazırlanan çözeltideki OTA konsantrasyonu zamana bağlı olarak HPLC'de analiz edilerek belirlenmiştir. Başlangıç anından itibaren HPLC ile 24 saat boyunca belirli aralıklarla izlenmiştir.

Aynı işlem 2000,3000,4000 ve 5000 µg/ml SO₂ için tekrarlanmıştır.

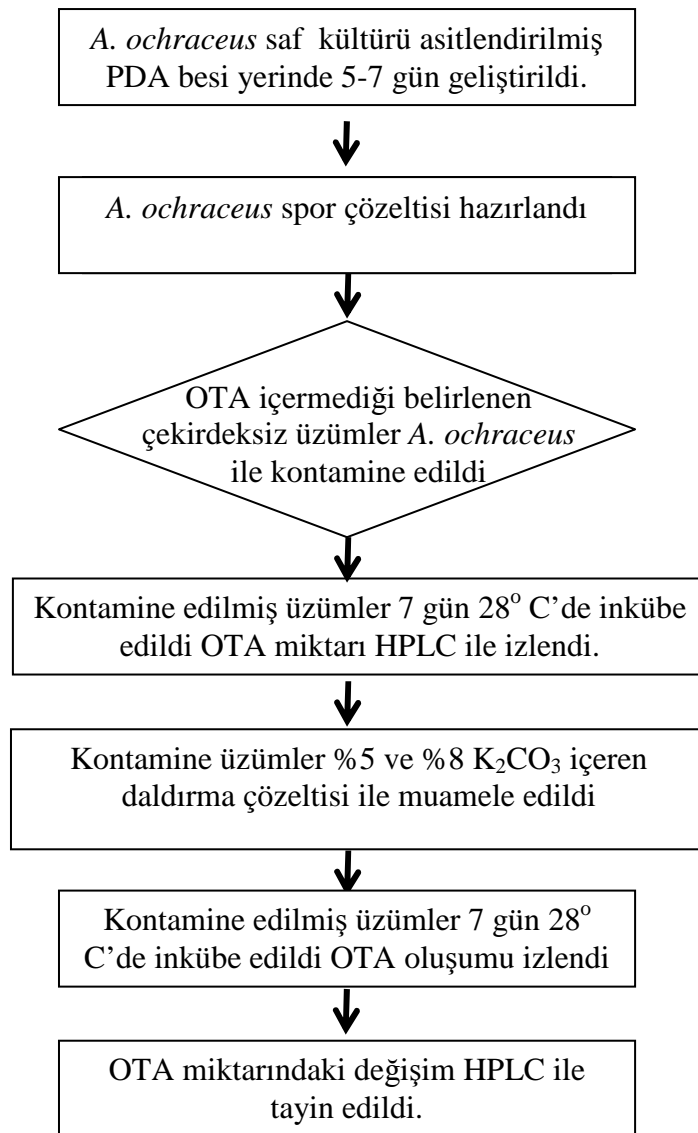
3.4.5 Okratoksin- α'nın hazırlanması:

Standardın hazırlanmasında OT- α oluşturma aktivitesi bilinen siğir pankreasından izole edilen karboksipeptidaz A (EC 3.4.17.1 – Sigma, type II-PMSF) enzimi kullanılmıştır. 25µL OTA stok çözelti 1 (3.3.1) alınmış ve 40 °C 'de kuruluğa kadar uçurulmuştur. Üzerine 50 µL enzim eklenmiş ve hacmi pH 8 fosfat tamponu ile 1 mL ye tamamlanmıştır. Bu çözelti 37°C'de 1 gün süreyle bekletilmiştir (Abrunhosa et al.,2006).

3.4.6 Hasat sonrası prosesin yapay kontamine numunelere uygulanması

Bu çalışmada, İzmir bölgesinden temin edilen OTA içermediği HPLC analizleri sonucunda tespit edilen çekirdeksiz üzümler kullanılmıştır.

Sağlıklı üzüm taneleri *A. ochraceus* içeren spor çözeltisine daldırıldıktan sonra 30°C'de 1 hafta süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında üzümler üç farklı alt gruba ayrılmıştır. Bunlardan biri kontrol grubu olarak tutulmuş, diğer ikisi ise 15 saniye süreyle %5 K₂CO₃ ve %8 K₂CO₃ çözeltilerine daldırılmıştır. Kontrol grubu ve alkali ile işlem görmüş üzümler HPLC ile analiz edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Hasat sonrası prosesin yapay kontamine numunelere uygulanması

3.5 OTA Analizi:

3.5.1 Numune Hazırlama

- 10 g üzüm tartılarak 250 mL behere alınmıştır.
- 50 mL saf su ile ultraturrax homojenizatör yardımıyla yüksek hızda 1 dakika boyunca ekstrakte edilmiştir.
- Çözeltiye 50 mL %2 NaHCO₃ eklenerek yüksek hızda 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir.
- Numune Whatman No: 4 filtre kağıdından süzülerek 100 mL lik behere toplanmıştır.
- Çözeltiden alınan 10 mL lik filtrat 20 mL PBS ile seyreltilmiştir.
- IAK kullanımdan önce oda sıcaklığına getirilmiş ve 10 mL PBS 5 mL/min hızla geçirilmek suretiyle şartlandırılmıştır.
- 30 mL setreltilmiş numune IAK'dan 3 mL/min hızda geçirilmiş ve ayrılan çözelti atığa alınmıştır.
- IAK 2 kez 10 mL 20% MeOH geçirilmek suretiyle yıkanmıştır.
- IAK'dan OTA'nın toplanması için iki aşamalı prosedür uygulanmıştır. Öncelikle kolondan 1.5 mL MeOH geçirilmiş ve 3 mL'lik kalibreli balonjojeye toplanmıştır. İkinci aşamada kolondan 1.5 mL saf su geçirilerek 3 mL'lik balonjojeye alınmıştır.
- Çözeltide bulanıklığın olması durumunda numune tek kullanımlık 0.45 µm filtreden süzülerek HPLC de analiz edilmiştir.

3.5.2 Analiz Koşulları:

3.5.2.1 HPLC Koşulları:

Kolon : Zorbax Eclipse XDB C18 (4.6 x100mm, 3.5µ)

Hareketli Faz : Asetonitril:Su:Asetik asit (47:51:2)

Akış hızı : 1.0 mL/min

Kolon sıcaklığı : 40°C

Dedektör : Floresans Dedektör (FLD)

Ex: 332 nm

Em: 462 nm

Enjeksiyon hacmi : 20µL

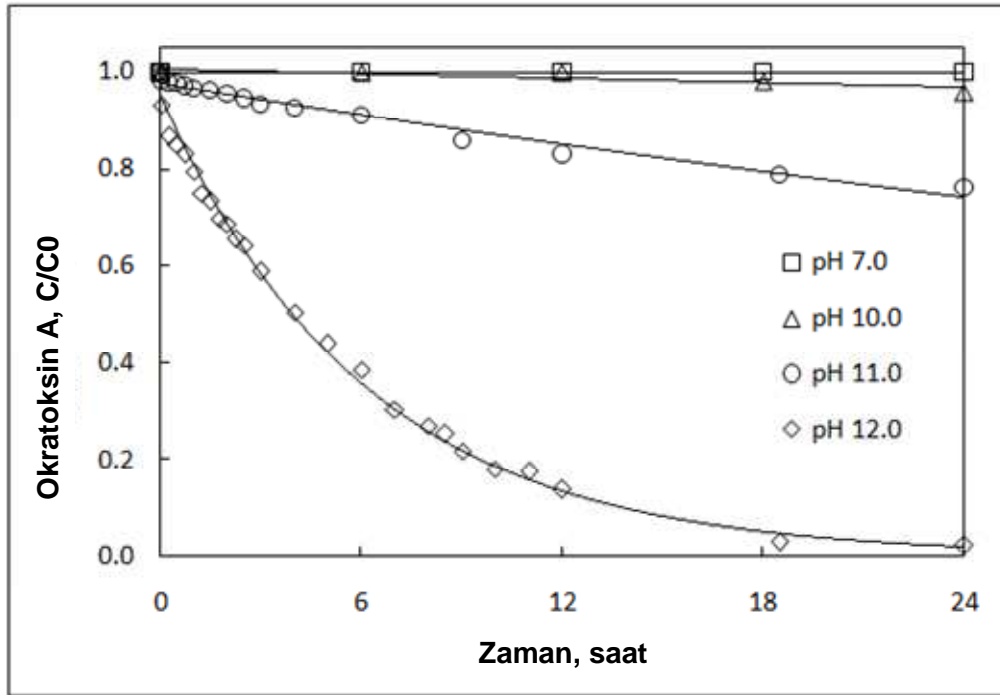
Analiz Süresi : 15 dakika

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 OTA'nın pH ile değişimi:

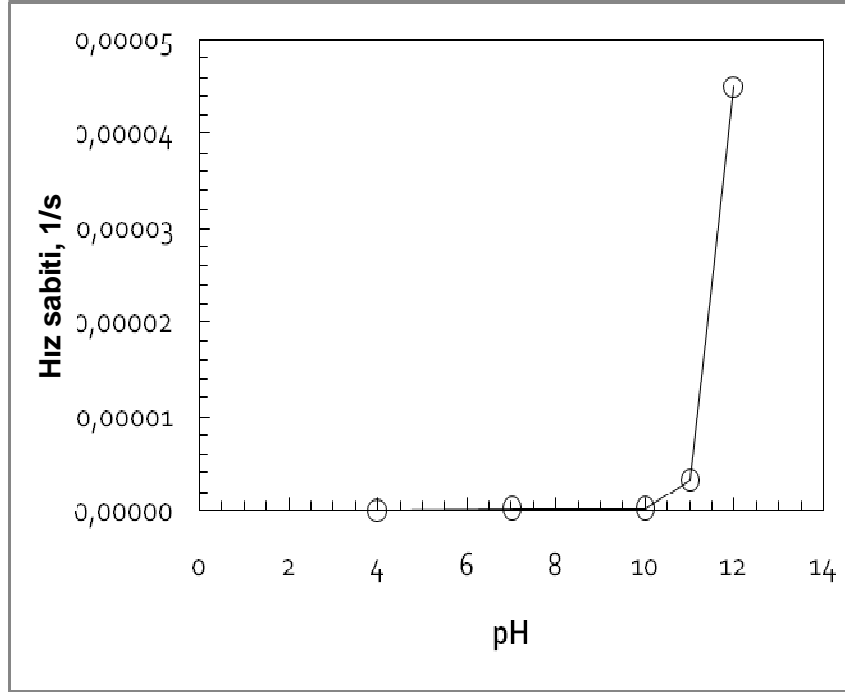
Bu çalışmada pH 4, 7, 10,11 ve12 tamponlarında OTA'nın zamana bağlı olarak değişimi oda sıcaklığında incelenmiştir. Tampon çözeltileri 20 ng/ml OTA içerecek şekilde hazırlanmıştır. OTA konsantrasyonundaki değişim, aynı çözeltiden alınan eşit hacimde örneklerin zamana bağlı olarak HPLC ile analizi yapılarak izlenmiştir.

şekil 4.1'de yer alan sonuçlar OTA stabilitesinin pH'ya kuvvetle bağlı olduğunu göstermektedir. Analiz sonuçlarına göre pH 10'un altındaki tampon zeltelerde OTA bozunması gözlenmemiştir. OTA bozunması pH 10 tampon zeltide başlamış ve daha yüksek pH'lı tampon zeltelerde farklı hızlarla devam etmiştir. şekil 4.2'de görüldüğü gibi pH 10'un üstündeki tampon zeltelerde pH'nın artmasıyla OTA bozunmasının hızının da arttığı gözlenmiştir.



şekil 4.1. pH'nın OTA stabilitesi üzerine etkisi

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi OTA bozunmasının pH 12’de oda sıcaklığında drastik olarak arttığı görülmüştür. OTA bozunumu pH 10’nun üstündeki ortamlarda çok hızlı gelişmektedir. Şekil 4.1 ve 4.2 OTA bozunmasının pH’ya bağlı olduğunu ve 1. dereceden kinetik eğilim gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.2. Farklı pH tamponlarında OTA bozunma hız sabitleri

Farklı pH tamponlarında OTA bozunması farklı hızlarda gerçekleşmiştir. pH’ya bağlı OTA bozunmasına ait hız sabitleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı pH değerlerinde OTA bozunma hız sabitleri

pH	Hız sabiti, 1/s	r
4.0	-- ^a	-- ^a
7.0	$2.78 \times 10^{-8} \pm 0.14 \times 10^{-8}$	0.938
10.0	$5.56 \times 10^{-8} \pm 0.50 \times 10^{-8}$	0.925
11.0	$3.25 \times 10^{-6} \pm 0.36 \times 10^{-6}$	0.986
12.0	$4.50 \times 10^{-5} \pm 0.54 \times 10^{-5}$	0.994

^a Bu pH’da bozunma gözlenmemiştir.

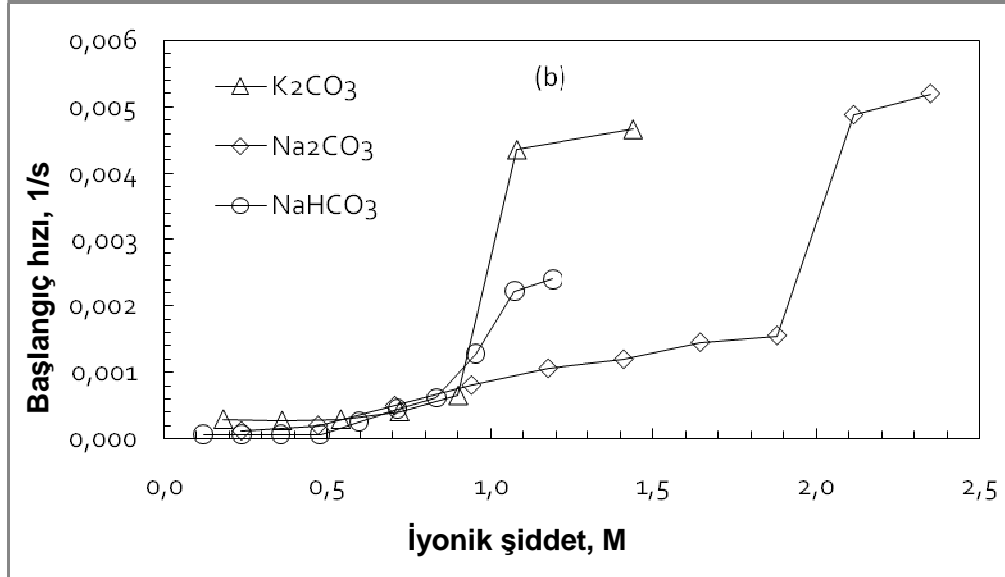
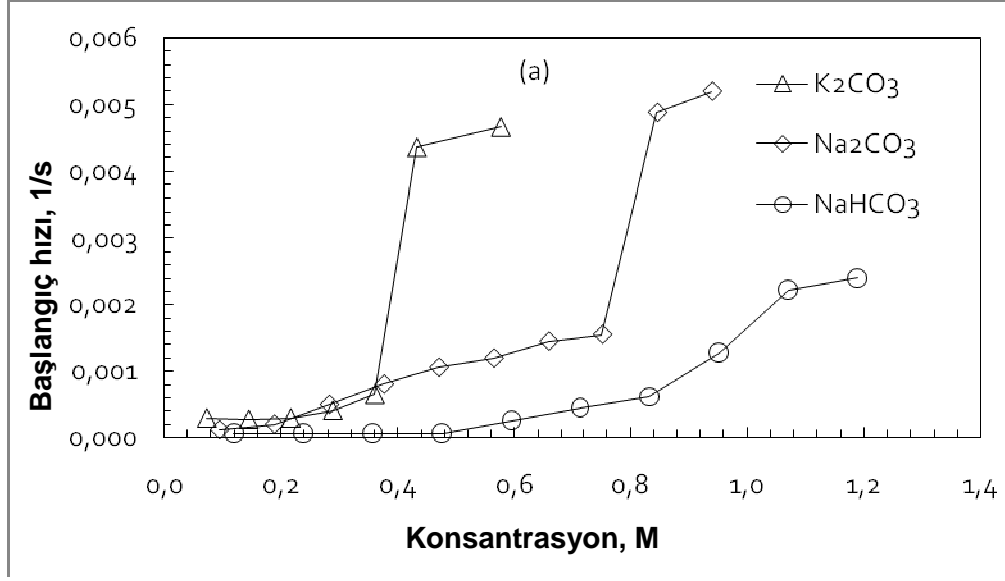
4.2. OTA'nın iyon tipi ve konsantrasyonu ile değişimi:

Üzüm kurutma prosesinde uygulanan bazik daldırma işlemleri üzümün potasyum karbonat veya sodyum karbonat çözeltilerine daldırılması şeklinde gerçekleşmektedir. Genel olarak güneş altında kurutmada kullanılan tuz miktarı %5-8 arasındadır. Bu bazik çözeltilerin pH aralığı ise ortalama olarak 11.6'dır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. %1-10 K₂CO₃ ve Na₂CO₃ çözeltilerinin pH değerleri

	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
K ₂ CO ₃	11.4	11.5	11.5	11.6	11.6	11.6	11.7	11.7	11.7	11.7
Na ₂ CO ₃	11.4	11.5	11.5	11.6	11.6	11.6	11.7	11.7	11.7	11.7
NaHCO ₃	8.4	9.2	9.5	9.1	8.4	8.1	9.0	8.7	8.8	8.1

Çalışmada, İyon çeşidi ve konsantrasyonunun OTA stabilitesi üzerine etkisi incelenmiştir. 0.072-0.720 M aralığında sodyum karbonat ve 0.094-0.940 M aralığında potasyum karbonat çözeltileri Çizelge 3.2' ye göre hazırlanmıştır. Şekil 4.3 iyon tipi ve konsantrasyonunun OTA'nın bozunması üzerine etkisini göstermektedir. Çizelge 4.2'de de görüldüğü gibi farklı konsantrasyonda tuz çözeltilerinin pH değerlerinin birbirlerine çok yakın olması nedeniyle görülen etkinin iyon çeşidi ve konsantrasyonuna bağlı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.3. İyon konsantrasyonu (a) ve İyonik şiddet (b)'in OTA bozunması üzerine etkisi

Analiz sonuçları potasyum karbonatın sodyum karbonata göre OTA bozunması üzerine daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bozunma hızınının 0.36 M potasyum karbonat ve 0.75 M sodyum karbonat çözeltilerinden sonra belirgin olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).

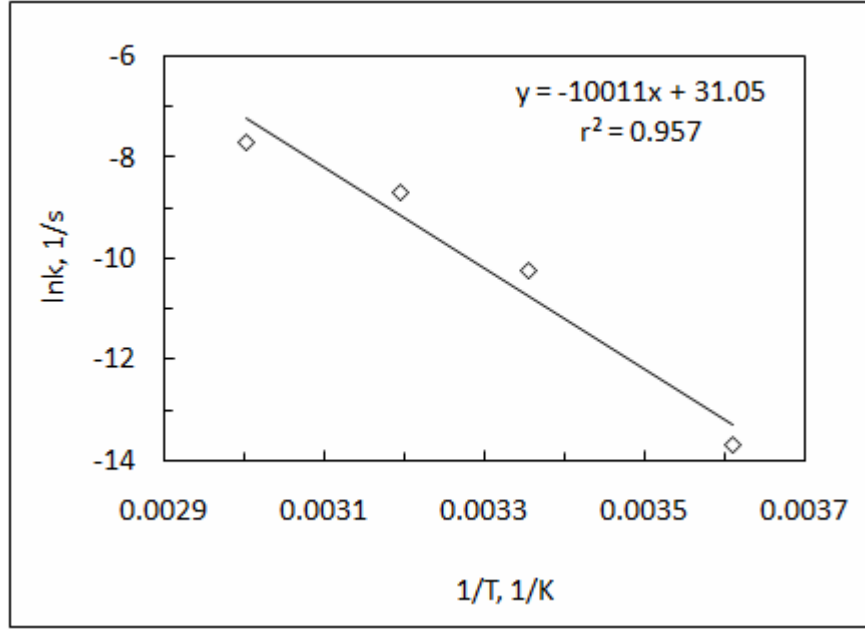
NaHCO₃ OTA analizinde genellikle ekstraksiyon çözeltisi olarak kullanılmaktadır. Sodyum bikarbonatın da sodyum karbonat ve potasyum karbonata nazaran daha az bir etkisi olmasına rağmen, OTA stabilitesi üzerine etkisi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3). %1-10 NaHCO₃ içeren çözeltilerin pH'ları incelendiğinde pH aralığının 8.5-9.0 arasında olduğu görülmektedir. Bu da OTA'nın bozunmasına pH etkisinin bir diğer kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

Sodyum bi karbonatın OTA bozunması üzerine bu etkisi dikkate alındığında yapılan bazı çalışmalarda geri kazanımın bağıl olarak düşük olmasının nedenin ekstraksiyon süresinin uzun olması veya çözelti içinde uzun süreli bekletilmesi sonucu olabileceği düşünülmektedir.

4.3 OTA yıkımının sıcaklığa bağımlılığının belirlenmesi:

Sıcaklığın artması da OTA bozunmasına etki eden bi diğer önemli faktördür. Bazik ortamda OTA bozunması ve sıcaklık etkisi arasındaki ilişki incelemek için kurutma prosesinde genellikle kullanılan %5 potasyum karbonat çözeltisi (0.36 M) seçilmiştir. 20 ng/ml OTA içeren 0.36 M model çözeltisindeki OTA bozunması 4, 25, 40 ve 60°C'de 24 saat süreyle incelenmiştir.

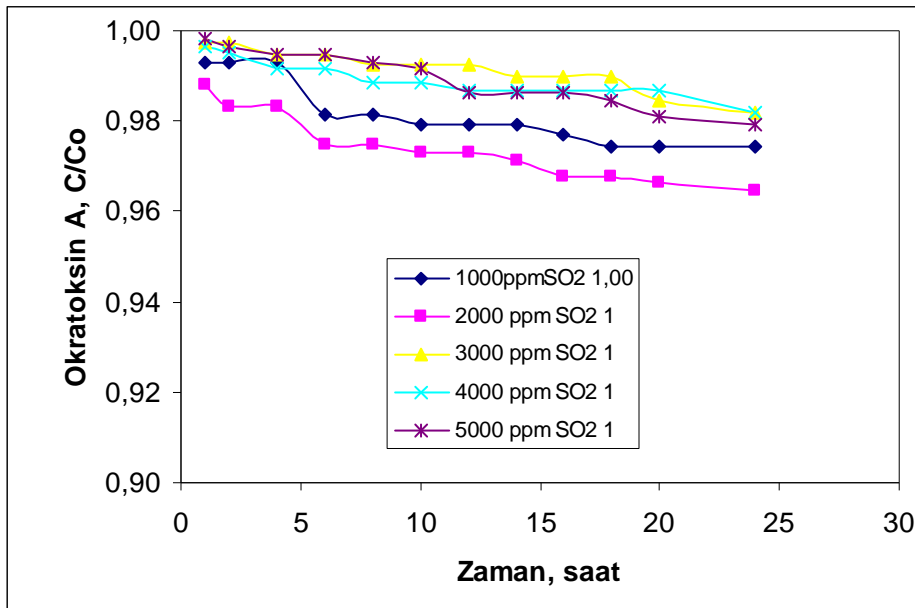
Sonuçlar, sıcaklığın da OTA bozunma hızı üzerine belirgin bir etkisi olduğunu kanıtlamaktadır. 0.36 M potasyum karbonat model çözeltisinde 40°C'deki bozunma hızı, 25°C'deki bozunma hızından yaklaşık 5 kat daha fazladır. Sıcaklığa bağlı OTA bozunması Arrhenius yasasına göre 83.23 kJ/mol olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. 0.36 M K₂CO₃ çözeltisinde OTA bozunması

4.4 OTA stabilitesi üzerine SO₂ Etkisi

SO₂'nin OTA stabilitesi üzerine etkisi 1000, 2000, 3000, 4000 ve 5000 ppm model çözeltiler içinde izlenmiştir. Analiz sonuçları farklı konsantrasyonlarda uygulanan SO₂ ile muamelenin OTA bozunması üzerine belirgin bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Şekil 4.5 OTA stabilitesi üzerine SO₂ etkisini ifade etmektedir.



Şekil 4.5. OTA stabilitesi üzerine SO₂ etkisi

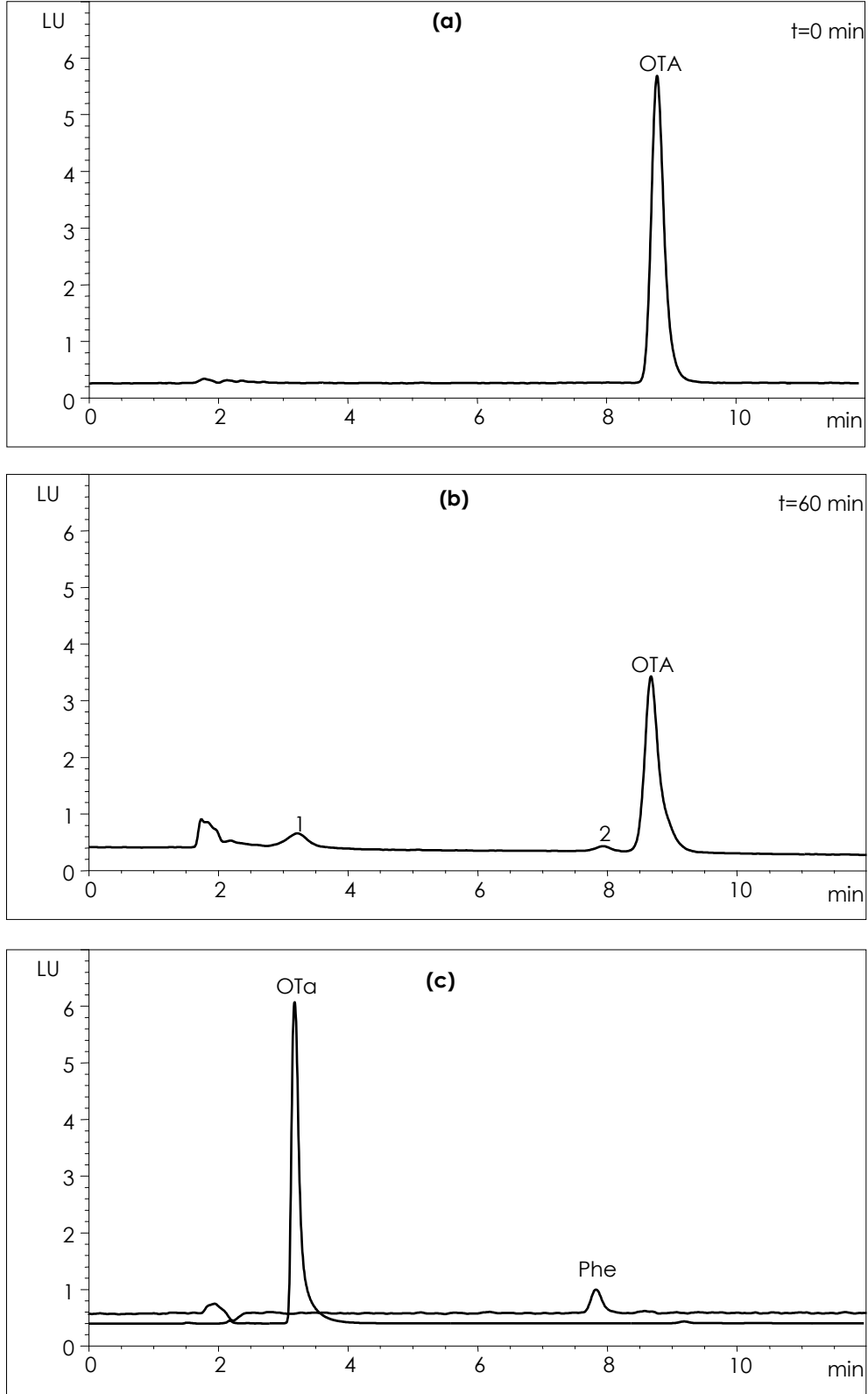
4.5 Bazik ortamda OTA bozunma mekanizması

Sonuçlar OTA'nın güçlü bazik ortamlarda stabil olmadığını göstermiştir. OTA stabilitesinin pH 10 ve üzerindeki pH'larda önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca iyon tipi, iyon konsantrasyonu ve sıcaklığın da OTA stabilitesi üzerine belirgin etkileri olduğu dikkati çekmektedir.

OTA'nın bozunması sonrasında oluşan muhtemel ürün ve metabolitler de bu çalışmada incelenmiştir. Şekil 4.6'da verilen kromatogramlarda, oda sıcaklığında güçlü bazik ortamda OTA'nın bozunması sonucunda iki yeni molekül oluştuğu görülmektedir. Şekil 4.6.b de görülen bilinmeyen 2 maddeye ait pik 0.36 M potasyum karbonat model çözeltisinin oda sıcaklığında 60 dakika bekletilmesi sonrasında gözlenmiştir.

Yeni oluşan moleküllerin floresan şiddeti bazik ortamda zamanla artarken, OTA'nın floresan şiddeti zamanla azalmaktadır. Bu durum, OTA'nın bazik ortamlarda sistematik bir şekilde bozunduğunun işareti olarak değerlendirilmektedir. Muhtemel bozunma ürünleri üzerinde yapılan çalışmada OTA'nın hidroliz olarak fenilalanin ve OT- α 'ya dönüştüğü öngörülmüştür. Bu yöndeki çalışmalar sonrasında 2 numaralı pikin Phe olduğu referans standart kullanılarak doğrulanmıştır. Figür 4.6.c'de görüldüğü gibi Phe'nin hidrofilik yapısı gereği alıkonma zamanı OTA'dan daha kısadır.

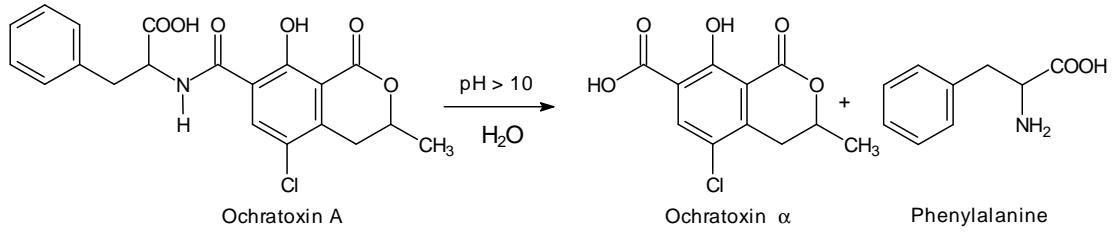
OTA'nın bazik muamelesi sonucu oluşan 1 numaralı bilinmeyen pikin OT α olduğu belirlenmiştir. Enzimatik olarak üretilen OT α ile doğrulama yapılarak bozunma ürününün yapısı aydınlatılmıştır (Şekil 4.6.c).



Şekil 4.6. 0.36 M potasyum karbonat model çözeltisi içinde OTA'nın bozunma ürünleri (a) Başlangıç kromatogramı, (b) 60 dakika sonra OTA'nın bozunma kromatogramı , (c) 100 ng/ml OTA 'nın karboksipeptidaz enzimi ile bozunması ile elde edilen OT- α ve saf Phe.

Bu çalışmada OT α , karboksipeptidaz enziminin OTA'nın yapısında bulunan amit bağına etki ederek OT α ve Phe oluşturması sonucu elde edilmiştir. Önceki çalışmalar da karboksipeptidaz enziminin memelilerde OTA'nın hidrolizine sebep olduğunu ve bozunma ürünleri olarak OT α ve Phe oluşturduğunu göstermiştir (Lund et al.,2003, Stander et al., 2001). Hidrolazların amit bağına kırıdıkları bilinmektedir (Bornscheuer et al., 1999, Stander et al., 2000).

Yukarıda belirtilen sonuçlara göre ve OTA'nın kimyasal yapısı dikkate alındığında güçlü bazik ortamda OTA'nın bozunarak OT α ve Phe'e dönüştüğü belirlenmiştir. Bozunma mekanizması Şekil 4.7 de gösterilmiştir.



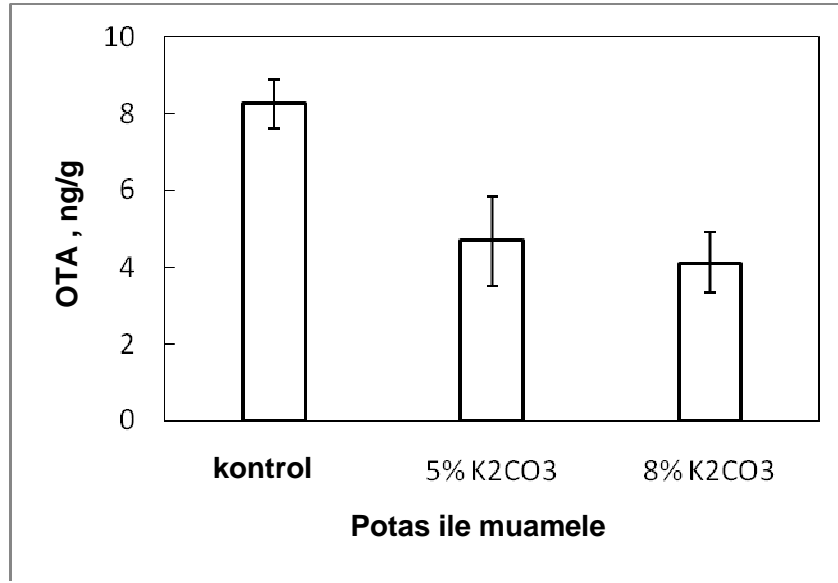
Şekil 4.7 Güçlü bazik ortamda OTA'nın hidrolizi sonucu OT- α ve Phe oluşum mekanizması.

OTA'nın hidrolizi sonucunda oluşan Ot- α 'nın toksik olmadığı kabul edilmektedir (Kuiper ve Grant 1990). Dolayısı ile Şekil 4.7'de gösterilen mekanizmanın, OTA dekontaminasyonu için çok uygun bir alternatif oluşturduğu düşünülmektedir.

4.6 Potasyum karbonat çözeltisine daldırma ile üzümde OTA dekontaminasyonu

Model ortamlarda gerçekleştirilen mekanistik çalışmalar sonucunda kuvvetli bazik ortamlarda OTA'nın büyük bir hızla bozunduğu belirlenmiştir. Bu durumun, kuru üzümde, diğer kurutulmuş meyvelere nazaran çok daha az miktarlarda OTA miktarlarının tespit edilmesinin nedeni olabileceği düşünülmektedir. Çünkü, üzüm kurutulmadan önce kısa süreli olarak bazik çözeltilere daldırılmaktadır.

Elde edilen sonuçlar ışığında, uygulanan daldırma işleminin üzümlerde hasat öncesi kontaminasyon sonucu oluşan OTA miktarlarında ciddi azalmaya neden olacağı öngörülmektedir. Bu stratejinin test edilmesi amacıyla laboratuvar koşullarında *A. ochraceus* ile kontamine edilmiş üzümler kullanılmıştır. Kontamine edilmiş üzümlerde OTA miktarı proses öncesinde 8.26 ± 0.64 ng/g olarak tespit edilmiştir. %5 ve %8 potasyum karbonat içeren daldırma çözeltileri ile 15 saniye muamele sonrasında OTA seviyesinin %43.2 ve %50.0 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Yapay olarak kontamine edilmiş üzümlerde bazik muamelenin OTA miktarı üzerine etkisi

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen temel bulgular, OTA stabilitesinin kuvvetli bazik ortamlarda belirgin şekilde azaldığını göstermektedir. Yüksek pH değerlerinde OTA yapısında çok yüksek hızlarda bozunum meydana gelmektedir. Bozunumun mekanizması, hidroliz yolu ile Ota ve Phe oluşumu şeklindedir. Bazik ortamda oluşan bozunum ürünleri toksik olmadığı kabul edildiğinden, bu durum OTA dekontaminasyonu için önemli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir.

Üzümler ile gerçekleştirilen testlerde, %5 ve %8 potasyum karbonat çözeltisine 15 saniye gibi kısa süreli daldırma ile üzümlerdeki OTA miktarının yarı yarıya azaltılabildiği gözlenmiştir. Bu sırada sıcaklığın ve/veya sürenin artırılması ile, OTA miktarlarının daha da azaltılması olanaklı görülmektedir.

Mikotoksinler tarım ürünlerinde sıklıkla rastlanan bir problemdir. Dolayısıyla mikotoksin dekontaminasyonu üzerinde sıklıkla ve ciddi şekilde durulan bir konudur. Yasal otoriteler gıdalardaki mikotoksin seviyelerinin iyi tarım pratikleri ve iyi üretim teknikleri kullanılarak mümkün olduğunca düşük seviyelere indirilmesi gerektiğini ifade etmektedirler. Bu çerçevede bakıldığında, üzümlerin kurutulması sırasında uygulanan bazik çözeltiye daldırma işleminin OTA dekontaminasyonu için etkili bir yöntem olarak ortaya çıktığı görülmektedir. Bu yöntemin, benzer şekilde diğer kuru meyvelerin üretimine ne ölçüde uygun olacağının test edilmesinde OTA dekontaminasyonu bakımından büyük yarar olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

Abarca, M. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Castella, G., Cabañes, F. J. , 2003, Contamination in dried vine fruits from the spanish market J.Food Prot., 66, 504-506.

Abrunhosa L., Santos L., Venancio A. , 2006, Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger* ,Food Biotechnol. , 20, 231-242.

Almela, L., Rabe, V, Sánchez, B., Torrella, F., López-Pérez, J. P., Gabaldón, J. A., Guardiola L., 2007, Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material, Food Microbiology, 24, 4, 319-327.

Akçelik, M, Halkman A. K., Tunail N., Ayhan K., Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2000, Armoni, Ankara.

Aksoy U., Eltem R., Meyvaci K. B., Altindisli A., Karabat S. ,2007, Five-year survey of ochratoxin A in processed sultanas from Turkey, Food Addit.Contam., 24, 292-296.

Arici , M., Gumus, T., Kara, F.,2004, The fate of ochratoxin A during the Pekmez production from mouldy grapes, Food Control, 15, 597–600.

Anonymus. WHO, 1979, Environmental Health Criteria:\ 1 Mycoto- xins, World Health Organization, Geneva

Anonymus, WHO, 2000, Fumonisin B1, Environmental Health Criteria 219, World Health Organization, Geneva

Battilani, P., Magan , N., Logrieco A., 2006, European research on ochratoxin A in grapes and wine, International Journal of Food Microbiology, 111, 2–4.

- Bellí, N., Pardo, E., Marín, S., Farré, G., Ramos, A.J., Sanchis, V. , 2004, Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *J. Sci.Food Agr.*, 84, 541-546.
- Bornscheuer, U. T., Kazlauskas, R. J. , 1999, *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH: Weinheim, Germany
- Bruinink, A , Rasonyi, T : Sidler, C, 1998, Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin-alpha in vitro, *Nat-Toxins*,6(5),173-7.
- Cemeroğlu B., Acar J.Meyve ve sebze işleme teknolojisi, Gıda Teknoloisi Derneği, 6, Ankara, 1986.
- Chelkowski, J., Golinski, P., Godlewska, B., Radomska, W., Szebiotko, K, Wiewiorowska, M.,1981, Inactivation of ochratoxin A and other mycotoxins during ammoniation. *Mycotoxins in cereal grain. Part IV.Nahrung*, 25, 631-637.
- Comission Regulation (EC) N° 123/2005 of January amending Regulation (EC) N° 466/2001 as regards ochratoxin A. *Official J. European Union L 25 (2005)* 3-5.
- Dış Ticaret Müsteşarlığı Çekirdeksiz Kuru Üzüm Tebliği (2005/19)
- Fouler, S. G., Trivedi, A. B., Kitabatake, N. ,1994, Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. , *J. AOAC Int.*, 77, 631-637.
- Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O.,Dutler, H. ,2001, Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents, *Toxicol. Lett.*,122, 179-188.

- IARC, 1993, International Agency for Research on Cancer. Ochratoxin 251 A. In: Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Scientific Publications, 56, Lyon, France, 489-521.
- Jones JM, 1993, Food Safety, Chapter 7, page 141-154, Eagan Press, Minnesota.
- Juan, C., Moltó, J.C., Lino C.M. , Mañes J. , 2008 Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal, Food Chemistry, Volume 107, Issue 1, 525-530.
- Juan, C. , Lino, C.M. , Pena, A. , Moltó, J.C., Mañes, J., Silveira, I., 2007, Determination of ochratoxin A in maize bread samples by LC with fluorescence detection, Talanta, 73, 2, 246-250.
- Koshinsky HA, Khachatourians GG, Mycotoxicoses: the Effects of Mycotoxin Combinations. In: Foodborne Disease Handbook (eds. Hui YH, Gorham JR, Murrell KD, Cliver DO.) Volume 2, Chapter 17, page 463-520, Marcel Dekker Inc, New York 1994.
- Kuiper-Goodman T., Grant DL. 1990, Ochratoxin A report (WHO Food Additives Series 28)- Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA).
- Lund, F., Frisvad, J. C. ,2003, *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. J. Appl. Microbiol., 95, 1117–1123.
- MacDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E.A., Shepherd, M.J., 1999, Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. Food Addit. Contam., 16, 253-260.

- Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, M. L., Fernández-Juri, M. G., Barberis, C., Dalcero, A. M., 2007, Ochratoxin A and *Aspergillus* section Nigri in peanut seeds at different months of storage in Córdoba, Argentina., Int J Food Microbiol., 7, 1785-1795
- Marasas W.F.O., Nelson, P.E. ve Toussoun, T.A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species, Identity and Mycotoxicology. Penn State Univ. Press, University Park.
- Mateo, R., Medina, Á., Mateo, E. M., Mateo, F., Jiménez, M., 2007, An overview of ochratoxin A in beer and wine, International Journal of Food Microbiology, 119, 1-2, 79-83 .
- Marquardt, R. R., Frolich, A.A., 1992, A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. J. Anim. Sci., 70, 3968-3988.
- Meyvacı K. B., Altindisli A., Aksoy A., Eltem R., Turgut H., Arasiler Z., Kartal N., 2005, Ochratoxin A in sultanas from Turkey I: Survey of unprocessed sultanas from vineyards and packing-houses., Food Addit. Contam., 22, 1138-1141.
- Müller G., Weber H., Müller C., 1996, Mikrobiologie der Lebensmittel Grundlagen. Behr's Verlag ISBN 3-86022-209-0.
- Ostry, V., Ruprich, J., Skarkova, J. Raisins, 2002, Ochratoxin A and human health. Myco. Res., 18A, 178-182.
- Özay, G., Aran, N., Pala, M. ,1995, Influence of harvest and drying techniques on microflora and mycotoxin contamination of figs Nahrung ,39, 156-165.
- Palmgren MS, Hayes W, Aflatoxins in Foods, Mycotoxins in Food, (Ed. Krogh P.), page 65-95, Academic Press, London 1987.

- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004, Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins Food Sci. Tech. Int 10, 45-49.
- Pardo, E., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., 2005, Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes, Food Microbiology, 2005 (Vol. 22) (No. 5) 383-389.
- Peraica M, Radic B, Ludc A, Pavlovic M, 1999, Toxic Effects Mycotoxins in Human, Bulletin of the Health Organization, 77(9):754-766.
- Senyuva H.Z., Gilbert J., Ozcan S., Ulken U., 2005, Survey for Co-occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin B1 in Dried Figs in Turkey by Using a Single Laboratory-Validated Alkaline Extraction Method for Ochratoxin A. Journal of Food Protection, 68, 7, 1512–1515.
- Soyöz M., Özçelik N., 2002, Okratoksin A'nın Toksik Etkileri ve Eliminasyonu, T Klin Tıp Bilimleri, 22, 421-427.
- Stander M. A., Bornscheuer U. T., Henke E., Steyn P. S., 2000, Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A, J. Agric. Food Chem., 48, 5736-5739.
- Stander M. A., Steyn P. S., Westhuizen F. H., Payne B. E. A , 2001, Kinetic Study into the Hydrolysis of the Ochratoxins and Analogues by Carboxypeptidase A. Chem. Res. Toxicol., 14, 302 -304.
- Suarez-Quiroz M., Gonzales-Rios O., Barel M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.-P., 2004, Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee, Food

microbiology, 21, 629-634

Tayfur M, 1993, Besininlerdeki Küfler ve Mikotoksinler, Beslenme ve Diyet Dergisi, 22(1): 101-108

Tayfur M, 1996, Mikotoksinler ve Önemi, Standart, 7, 87-90.

Taşkaya B., 2003, Kuru Üzüm, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü (TEAE)- Bakış, 3, 7, 1-4.

Topal R.S., 2004, The mycotoxin profiles and dominant mycoflora distribution in foods and agricultural products in Turkey, British Food Journal, 106, 7, 494-511.

Varga J. and Kozakiewicz Z., 2006, Ochratoxin A in grapes and grape-derived products, Trends in Food Science & Technology, 17, 72-81.

Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L. 1965, Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. J. Chem. Soc. 7083-7088.

Varga, J., Kozakiewicz, Z. 2006, Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. Trends in Food Sci. Technol., 17, 72-81.

Weidenböcker M. (1999) Lebensmittel-Mykologie. Behr's Verlag Hamburg 376 S

Wilson B. 1984, Hazards of Mycotoxins to Public, Journal of Food Protection, Health, 41:375-384.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Süreyya ÖZCAN

Doğum Yeri : Isparta

Doğum Yılı : 1981

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1995-1999

Lisans 2000-2004

Yabancı Dil: İngilizce

e-mail : sureyyaozcan@yahoo.com

Deneyim

2003- Araştırmacı Asistanı, TÜBİTAK-Ankara Test ve Analiz Laboratuvarı

Çalışma Alanları

Enstrümantal Analiz : HPLC, LC/MS, GC/MS, UV-Vis. Spekr.

Gıda Analizleri: Tüm gıdalar (Vitaminler, Şekerler, Antibiyotikler, Aminoasitler, FAME, Uçucu bileşikler, Toksik maddeler)

Farmasötik Analizler : Beşeri ve Veteriner İlaçları

Mikotoksin Analizleri: Tüm uygulamalar (Aflatoksinler, Okratoksin A, Fumonisinler, Patulin, Zearalenon, Trichothecenes)

Çevre Analizleri : Pestisitler

Profesyonel Aktiviteler

XII. IUPAC Mikotoksin ve Fikotoksin sempozyumu, Sekreteryaya , Mayıs 2007, İstanbul

Proje

Araştırmacı Asistanı - COST-928 Action, EU FP, 2005-2007

Araştırmacı Asistanı- DEVELONUTRI, EU FP, 2007-

Sertifikalar

1. TUBITAK- Analitik Kalite Güvence Çalıştayı, Mayıs 2004, Ankara
2. LCMS (Ion Trap&Quadropole) Uygulamaları Çalıştayı, Şubat 2005 Ankara
3. GCMS RTL&DRS Uygulamaları Çalıştayı, Ekim. 2005, Ankara
4. LC and LC/MS' e yeni Bakış Çalıştayı, Mayıs 2006, Ankara
5. Light Isotopic Techniques-IRMS,Kasım 2007, Münih

Sunumlar

1. TUBITAK- Lise Öğrencileri Arası Araştırma Projeleri yarışması, Poster sunumu, Mayıs 1998 (Türkiye 2.liği)
2. V. Ulusal Kromatografi Sempozyumu ,Poster sunumu, Haziran ,2004, Eskişehir
3. III. Uluslararası Ege Analitik Kimya Günleri, Poster Sunumu, Ekim 2004, Muğla
4. Uluslararası Fındıkta Aflatoksin Çalıştayı, Konuşmacı, Trabzon, Mart 2005
5. Kuru Meyve Endüstrisinde Mikotoksinler Çalıştayı, Konuşmacı, Kasım 2005, İzmir
6. EU DG Trade / CSL Gelişmekte olan Ülkeler için Aflatoksin ve Okrratoxin A Eğitimi, Konuşmacı, Mayıs 2006, İngiltere
7. Antep Fıstığı, Yer fıstığı ve Kırmızı biberde Aflatoksin Problemi Çalıştayı, Konuşmacı, Kasım 2006, Kahramanmaraş
- 8.Gıda Güvenliğinde Mikrobiyoloji ve Mikotoksin Analizleri Çalıştayı, Konuşmacı, Mart 2007, Antalya
9. XII. Uluslararası Mikotoksin ve Fikotoksin Sempozyumu, Poster sunumu, Mayıs 2007, İstanbul

10. XII. Uluslararası Mikotoksin ve Fikotoksin Sempozyumu, Poster sunumu, Mayıs 2007, İstanbul
11. "Aflatoxin and Ochratoxin A in Traditional and Traded Turkish Food Products" III. National Mycotoxin Symposium, oral presentation, 26 May, 2007
12. Eğitim :Gıda analizleri, konuşmacı, Temmuz 2007, Ankara
13. Eğitim : Analitik kimyaya giriş ve Enstrumantal analiz uygulamaları, Konuşmacı, Ekim 2007, Ankara
14. "Recent advances in food analysis" 2. Uluslararası Gıda ve Beslenme Kongresi, poster, Ekim, 2007, İstanbul
15. "A Study on the Stability of Ochratoxin A" " 2. Uluslararası Gıda ve Beslenme Kongresi, poster, Ekim, 2007, İstanbul
16. Hayvan yemi ve hayvansal gıdalarda veteriner ilaç kalıntıları ve mikotoksinler Çalıştayı Ekim, Konuşmacı, 2007,Bursa

Yayınlar

Inam R., Çaykara T., **Özcan S.**, and Yagmur M. "Polarographic determination of Pb(II) and Cd (II) with selective removal of Se(IV) using ionic poly(N,N-dimethylacrylamide-co-allylthiourea) Journal of Analytical Chemistry , Vol. 60, No. 12 (1139-1144),2005

Senyuva H. Z, Akşahin İ., **Ozcan S.**, Kabasakal B. V., "Rapid, Simple and Accurate LC-DAD Validated Method for the Determination of Dipyrone in Solid and Liquid Dosage Forms"Analytica Chimica Acta Vol 547 (73-77),2005

Senyuva H. Z., Gilbert J., **Ozcan S.** and Ulken U. "Survey for co-occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in dried figs in Turkey using an in-house validated basic extraction method for ochratoxin A"Journal of Food Protection, Vol 68 No7 (1512-15), 2005

Ozcan S. , Senyuva H. "Improved and simplified APCI-LC\MS method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods" Journal of Chromatography A Vol: 1135 (179-185), 2006

enyuva H, Gilbert J, **Ozcan S** and Gurel N., 'Geleneksel ve ticari Türk gıda ürünlerinde aflatoksin ve Okratoksin A varlığının incelenmesi' Food Technology Magazine (Scientific Article), Article, August 2007

Özcan S., Şenyuva H.Z.. Improved and Simplified Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry Method for the Analysis of Underivatized Free Amino Acids in Various Foods, Agilent Application note, 5989-5836EN

Şenyuva H.Z., Gilbert J., Samson R.A., **Özcan S.**, Öztürkoğlu Ş., and Önal D., Fungal identification and toxin occurrence in individual Turkish dried figs, World Mycotoxin Journal (Feb.2008)

Senyuva H, Gilbert J, **Ozcan S.** and Gurel N., Rapid LC and LC/MS for routine analysis of mycotoxins in foods, IUPAC preceedings, World Mycotoxin Journal (March.2008)

Özcan S., Gökmen V., Investigation of the Effects of Alkaline Treatment on the Degradation of Ochratoxin A in Grapes, Journal of Agricultural and Food Chemistry, (in review)

Senyuva H., **Ozcan S.**, Cimen D., Gilbert J., 'Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Determination of Fumonisin B1 and B2 in Corn and Processed Corn Products: Single Laboratory Method Validation', Journal of AOAC International (In review).

Kabasakal B. V., **Ozcan S.**, and. Senyuva H.Z. "Determination of Some Nicotinoid Type Insecticides Analysis in Hazelnut and Hazelnut Products by HPLC/DAD with LC/MS Confirmation" Analytica Chimica Acta ,Article (in review)