T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ÇEŞİTLİ GIDALARDA OKRATOKSİN A VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

ALPEREN TOSUN

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SİBEL ÖZDEN

FARMASOTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASOTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Alperen Tosun tarafından hazırlanan Çeşitli Gıdalarda Okratoksin A Varlığının Araştırılması başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

31 / 07 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Prof.Dr. BUKET ALPERTUNGA
İ. Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

2.Prof.Dr. GÜLDEN Z. OMURTAG
M. Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

3.Doç.Dr. SİBEL ÖZDEN
İ. Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

4.

5.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Alperen TOSUN

İTHAF

Anneme, Babama, Eşim Esra'ma,Murat abime ve Tuğba ablama ithaf ediyorum…

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans programına hak kazanmamda ve eğitim sürecimin her aşamasında benden yardımını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya;

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, benim için büyük bir sabır ve özveri gösteren çok kıymetli Danışman hocam Doç. Dr. Sibel Özden'e;

Eğitim sürecim boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Gül Özhan'a;

Deneysel çalışmalarım ve Yüksek Lisans Tez çalışmam boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Kimyager Fatih Mehmet Sarı abime;

Her zaman yardımlarını esirgemeyen Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri ve Çalışanlarına;

ve eğitim hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayan ihtiyaç duyduğum heranda yanımda olan başta Tuğba ablam ve Murat abime, koşullar ne olursa olsun desteğini esirgemeyen Aileme ve canım eşim ESRA'ma

Teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:25266.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİ
ABSTRACT ..... Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Mikotoksinler 3
2.1.1. Mikotoksin Oluşumuna Neden Olan Küfler 3
2.1.2. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler 5
2.1.3. Mikotoksin Maruziyeti 5
2.1.4. Mikotoksinlerin Toksik Etkileri 6
2.1.5. Mikotoksinlerin Dekontaminasyonu ve Zararlarının Azaltılması 9
2.2. Okratoksinler 10
2.2.1. OTA'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 11
2.2.2. OTA Oluşumuna Sebep olan Küfler 12
2.2.3. OTA Oluşumunu Etkileyen Faktörler 12
2.2.4. OTA'nın Toksikokinetik Özellikleri 13
2.2.5. OTA'nın Akut Toksik Etkileri 14
2.2.6. OTA'nın Kronik Toksik Etkileri 14
2.2.7. İnsanların OTA'ya Maruziyeti 16
2.2.8. Gıda Ürünlerinde OTA ile İlgili Yasal Düzenlemeler 17
2.3. Kırmızı Biberlerde Mikotoksin Sorunu 19
2.3.1. Kırmızı Biberlerde OTA ile ilgili Dünyada Yapılmış Çalışmalar 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 23

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler 23
3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar 23
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler 25
3.4. Kullanılan Çözeltiler 25
3.4.1. OTA Standart Çözeltileri 25
3.4.2. Fosfat Tamponu 26
3.4.3. Mobil Faz Çözeltisi 26
3.5. Örneklerin Hazırlanması 26
3.5.1. Örneklerin Toplanması 26
3.5.2. Örneklerin Ekstraksiyonu ve İmmünoafinite Kolon ile Temizleme 26
3.6. OTA'nın Fluoresans Dedektör Donanımlı HPLC ile Analizi 27
3.7. Yöntemin Validasyonu 28
3.7.1. Seçicilik 28
3.7.2. Doğrusallık 28
3.7.3. Doğruluk 28
3.7.4. Kesinlik 29
3.7.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ) 29
3.7.6. Kararlılık 29
3.7.7. Konfirmasyon 30
3.8. Örneklerin Analizi 30
4. BULGULAR 31
4.1. Yöntemin Validasyonu 31
4.1.1. Seçicilik 31
4.1.2. Doğrusallık 32
4.1.3. Doğruluk 33
4.1.4. Kesinlik 34
4.1.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ) 35
4.1.6. Kararlılık 35
4.1.7. Konfirmasyon 35
4.2. Örneklere ait Analiz Sonuçları ve OTA'nın Maruziyet Değerlendirmesi 36
5. TARTIŞMA 41
KAYNAKLAR 46
ÖZGEÇMİŞ 56

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler (Doyle ve ark. , 1997; Golob, 2007). 4
Tablo 2-2: Önemli mikotoksinler, üretici küfleri, kontamine olan ürünler ve toksik etkileri (Kotsonis and Burdock, 2013, p. 1338). 8
Tablo 2-3: R-sübstitüsyon gruplarına göre okratoksin türevleri. 10
Tablo 2-4: Çeşitli hayvan türlerinde OTA'nın veriliş şekillerine göre LD_{50} düzeyleri. 14
Tablo 2-5: Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne göre gıdalarda belirlenen maksimum OTA limitleri (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011) 18
Tablo 2-6: Dünyada kırmızı biberlerde OTA ile ilgili yapılan çalışmalar 21
Tablo 3-1: OTA analizi için optimum kromatografik çalışma koşulları. 28
Tablo 4-1: OTA standartlarına ait kalibrasyon eğrisinin ortalama pik alanları, SD ve RSD (%) değerleri (n=4) 32
Tablo 4-2: OTA'nın kırmızı pul biber örneklerine yapılan katım sonucu elde edilen geri kazanım (%), SD ve RSD (%) değerleri (n=4). 33
Tablo 4-3: OTA'nın kırmızı pul biber örneklerine yapılan katım sonucu hazırlanan kalibrasyon eğrisine ait ortalama pik alanları, SD ve RSD (%) değerleri (n=4). 34
Tablo 4-4: Gıda maddelerinde mikotoksinlerin seviyesinin resmi kontrolü için analiz metodu kriterleri (28026 sayılı Resmi Gazete). 34
Tablo 4-5: Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları (n=4). 35
Tablo 4-6: Tez çalışmasında analiz edilen kırmızı pul biber örneklerindeki OTA düzeyleri 39
Tablo 4-7: Tez çalışmasında analiz edilen kırmızı pul biber örneklerinde OTA varlığı 40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Mikotoksinlerin insanlara geçiş yolu (Akdeniz, 2009). 6
Şekil 2-2: Okratoksinlerin kimyasal yapısı. 10
Şekil 2-3: OTA'nın kimyasal yapısı. 11
Şekil 4-1: a) OTA tespit edilmeyen kırmızı biber örneğine ait kromatogram, b) 2 μg/kg konsantrasyonda olacak şekilde OTA ile katım yapılmış kırmızı pul biber örneğine ait kromatogram. 31
Şekil 4-2: OTA standardına ait kalibrasyon eğrisi. 32
Şekil 4-3: OTA'nın kırmızı pul biber örneklerine yapılan katım sonucu elde edilen elde edilen kalibrasyon eğrisi. 33
Şekil 4-4: a) OTA standartına (5 μg/kg) ve b) OTA-metil esterine ait kromatogramlar. 36
Şekil 4-5: OTA tespit edilmemiş kapalı olarak satılan kırmızı pul biber örneğine ait kromatogram. 37
Şekil 4-6: 0,38 μg/kg konsantrasyonda OTA tespit edilmiş kapalı olarak satılan kırmızı pul biber örneğine ait kromatogram. 37
Şekil 4-7: 31,73 μg/kgkonsantrasyonda OTA tespit edilmiş açıkta satılan kırmızı pul biber örneğine ait kromatogram. 37

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFG1	Aflatoksin G1
AFG2	Aflatoksin G2
AFM1	Aflatoksin M1
Aw	Su aktivitesi
BEN	Balkan Endemik Nefropatisi (‘Balkan Endemic Nephropathy’)
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (‘The International Agency for Research on Cancer’)
JEFCA	Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü’nün Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Uzman Komitesi (‘Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives’)
LD_{50}	Bir ilacın verildiği popülasyonda bireylerin %50’sini öldüren doz
LOAEL	En düşük advers etkinin gözlendiği değer (‘Lowest observed adversed effect level’)
OTA	Okratoksin A
PTWI	Kesin olmayan tolare edilebilir haftalık değer (‘Provisional tolarable weekly intake’)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (‘World Health Organization’)

ÖZET

Tosun, A.B. (2015).Çeşitli Gıdalarda Okratoksin A Varlığının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Okratoksin A (OTA), *Penicillium* ve *Aspergillus*türü küfler tarafından üretilen ve çeşitli tahıl ürünleri, kuru meyveler, yer fıstığı, kahve, kakao, baharat, şarap, bira ve bazı hayvansal ürünlerde rastlanan bir mikotoksindir. Bütün memelilerde nefrotoksik hepatotoksik, karsinojenik, teratojenik ve immünotoksik etkileri kanıtlanmış olan OTA, Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsüsü (IARC) tarafından olası insan kanserojeni (Grup 2B) sınıfına alınmıştır. Aynı zamanda Güneydoğu Avrupa Ülkelerinde görülen Balkan Endemik Nefropatisi (BEN), idrar yolları tümörleri ile Mısır ve Tunus'ta görülen ve etyolojisi tanımlanamayan nefropatilerin sorumlusu olarak da görülmektedir.OTA ile kontamine olmuş tahıl, hububat, şarap, kahve, kakao, baharat ve kurutulmuş meyveler insanlarda kronik maruziyete sebep olabilmektedir. Türkiye'de tahıl, tahıl ürünleri, kurutulmuş meyve, hayvan yemi, üzüm ve üzüm ürünlerindeOTA'nın varlığı ile ilgili çalışmalar mevcutken, kırmızı pul biberlerde OTA varlığı ile ilgili sadece bir çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, çalışmadakırmızı pul biber örneklerinde OTA düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır. İstanbul'un değişik semtlerindeki çeşitli pazar ve marketlerinden kırmızı pul biber örnekleri toplandı.OTA, sıvı/sıvı ekstraksiyon ve immunoaffinite kolon ile temizlemenin ardından fluoresans dedektör donanımlı ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi (HPLC) ile tayin edildi. Kapalı olarak satılan kırmızı pul biber örneklerinin %87,10'sinde 0,055-0,98 µg/kgkonsantrasyonlarda, açıkta satılan kırmızı pul biber örneklerinin %100'ünde ise1.12-31,74 µg/kg oranlarında OTA'ya rastlanmıştır. Açıkta satılan toplam 44 adet kırmızı pul biber örneğinin4 tanesinde (% 9,09) 15 µg/kgüzerinde OTA'ya rastlanmış olup, bu değerTürk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Komisyonu tarafından izin verilen maksimum değerlerin (15 µg/kg) üzerindedir. Bu yüzden risk değerlendirme sürecinde kırmızı biberlerdeki OTA varlığının iyi bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Okratoksin A, kırmızı pul biber, immünoafinite kolon, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:25266.

ABSTRACT

Tosun, A.B. (2015). Occurence of OTA in Various Food Products. Istanbul University,Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis.Istanbul.

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by toxigenic mould species (Penicillium and Aspergillus), which occurs in a variety of products, including cereals, spices, wine, dried fruit, cocoa, coffee beans, peanuts, beer and fruit juices. OTA has been shown to be nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic and immunotoxic to several species of animal and cause kidney and liver tumors in all mammals. As far as humans concerned, the IARC (International Agency for Research on Cancer) classified OTA as a possible carcinogen to humans (Group 2B). With regard to nephrotoxicity, OTA is considered to be involved in the Balkan Endemic Nephropaty (BEN), a severe kidney pathology, generally occurring in some areas of South-Eastern Europe and linked to urinary tracttumors in Agypt and Tunisia. OTA may contaminate several food commodities including cereals, wine, coffee, cacao, spices or dried fruits, resulting in chronic human exposure. While studies have been carried out in Turkey with regard to the presence of OTA in cereals, cereal-derived products, dried fruits, animal feeds, grapes and grape products, there is no published data on the occurrence of OTA in spices especially red pepper powder consumed in Turkey. Therefore, the objective of present study was to investigate the presence of OTA in red pepper powder commercialized in Turkey. A total of 75 samples were collected from different supermarkets and traditional bazaars in Istanbul during 2013-2014 years. The analytical methods used in our study involved the liquid/liquid extraction of OTA, immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography determination with fluorescence detection. The frequency of OTA contamination were 87,10% with the range concentration of 0,055-0,98 μg/kg in the for brandedred pepper powder, while in non-branded red pepper powder 100% of samples were contaminated with OTA in the range of 1,12-31,74 μg/kg. However, 4 of 44 (9,09%) branded red pepper powder samples had higher levels than permitted by the Turkish Ministry of Agriculture and Rural Affairs and the European Commission (15 μg/kg) for safe consumption. Therefore, it is suggested that OTA content should carefully be monitored in red pepper powder samples for risk assessment process.

Key Words: Ochratoxin A, ped pepper powder, immunoaffinity column, high performanceliquid chromatography.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 25266.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler, çeşitli küfler tarafından salgılanan ikincil metabolitler olup, çeşitli gıda ürünlerini kontamine edebilir. Doğrudan kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi ya da kontamine yemler ile beslenen hayvanlardan elde edilen besinlerin tüketilmesiyle insanlara maruziyet gerçekleşir. İnsan ve hayvanlarda mikotoksinlerin sebep oldukları olaylar mikotoksin zehirlenmeleri "mikotoksikozis" olarak bilinmektedir. Bu durum, mikotoksinin kimyasal yapısına, toksik etkilerine maruz kalma süresine, kişinin yaş ve beslenme durumuna, kişinin maruz kaldığı diğer kimyasallarla toksinin kimyasal etkileşimine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Mikotoksinler içinde en çok incelenen ve toksisite oluşturma potansiyeli en yüksek olanı, aflatoksin grubundan hepatotoksik ve karsinojenik özellikteki Aflatoksin B1'dir. Son yıllardaki mikotoksin çalışmalarında üzerinde yoğunlaşılan diğer mikotoksin grupları ise okratoksinler, patulin, trikotesenler, zearalenon ve sitrinindir.

Okratoksinler, aflatoksinlerin dışında doğada en yaygın bulunan mikotoksin grubudur. Okratoksinler, ilk kez 1965 yılında sorgum tanelerinden izole edilen *Aspergillus ochraceus* kültüründen izole edilmiştir (van der Merwe ve ark., 1965). Daha sonraki araştırmalarda dünya üzerinde ılıman iklimin hakim olduğu yerlerde yaygın bulunan bir depo küfü olan *Penicillium verrucosum'*un da okratoksinleri salgıladığı belirlenmiştir (Ciegler ve ark., 1972; van Walbeek ve ark., 1969). Okratoksinler içerisinde toksikolojik öneme sahip olan tek mikotoksin, Okratoksin A (OTA)'dır. Peptid bağı ile fenilalanin bağlanmış bir isokumarin türevi olan OTA'nın oluşumunu belirleyen en önemli iki faktör sıcaklık ve nemdir. Aynı zamanda OTA, başta Balkan ülkelerinin (Bosna, Bulgaristan, Hırvatistan, Romanya ve Sırbistan) kırsal bölge insanlarında görülen "Balkan Endemik Nefropatisi" (BEN) olmak üzere, Mısır ve Tunus'da görülen ve etiyolojisi bilinmeyen nefropatiler ve böbrek tümörlerinden de sorumlu tutulmaktadır (Mally ve ark., 2007). Elde edilen epidemiyolojik bilgiler, BEN'nin OTA içeren yiyecek tüketimiyle bağlantılı olduğu sonucunu desteklemektedir.

OTA tahıl ve tahıl ürünleride yaygın olarak bulunurken, kuru meyve, yer fıstığı, kahve, kakao, baharat, şarap, çay, bira, sirke, üzüm suyu, bebek maması ve bazı hayvansal ürünlerde de bulunduğu bildirilmiştir. Bugün OTA, gıda maddelerinde ve hayvan yemlerinde bulunabilen en tehlikeli bulaşıcılardan biri olarak kabul

edilmektedir. Bu nedenle birçok ülke, vatandaşlarını OTA bulaşmış gıda maddelerinin tüketimi sonucu ortaya çıkabilecek zararlardan korumak ve ihraç ettikleri ürünlerinin geri dönüşünü azaltabilmek için bir yandan yasal limitlerini belirlerken, öte yandan gıda maddelerindeki dağılımlarını ortaya koyacak tarama ve izleme programlarına yönelmektedir. Bu programlarla, hangi ürünlerde sorun olduğu belirlenmekte ve OTA oluşumunun kontrol edilmesine yönelik çalışmalara yön verecek veriler elde edilebilmektedir. Bu şekilde sistemli bir yaklaşımla gelişmiş ülkelerde sorun önemli ölçüde azaltılabilmiştir. Türkiye'de 29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan 'Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği' yürülükte olup, bu yönetmelikte baharatlar için limit değer 15 μg/kg olarak bildirilmiştir (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011).

OTA'nın, gıda maddelerinde ve hayvan yemlerinde kontrolü büyük önem taşımaktadır. Ancak ülkemizde henüz OTA'ya maruziyetin derecesinin ortaya çıkmasına yetecek sayıda araştırma yapılmamıştır. Meşeci ve Alpertunga (2001) tarafından mısır ve mısır ürünlerinde OTA tayini gerçekleştirilmiş olup, Anabilim Dalımızda gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da tahıl ürünlerinde (kahvaltılık gevrekler, bebek mamaları) ve tarhanada (Ozden ve ark., 2012) ve kuru üzüm, üzüm suyu ve pekmez ürünlerinde OTA seviyesi (Akdeniz ve ark., 2013) araştırılmıştır.

Tez çalışmasında İstanbul'un çeşitli semtlerindeki pazar ve marketlerden toplanan toplam 75 adet kırmızı pul biber örneğinin analizinin yapılması amaçlanmıştır. Örnekler, kapalı markalı ambalajlarda ve baharatçılarda açıkta markasız satılan kırmızı pul biberleri şeklinde gruplandırılarak, OTA'nın bu ürün gubunda risk değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Örneklerin analizinde Avrupa Birliği Komisyonu Direktifinde (Avrupa Birliği Komisyonu, SCOOP, Task 3.2.7, 2002) yer alan organik çözücüler ile ekstraksiyon ve immünoafinite kolon ile temizlemenin ardından valide edilmiş fluoresans dedektör donanımlı ters faz HPLC yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca, OTA'nın kırmızı pul biberlerde seviyelerinin belirlenmesinin yanında bireylerin maruziyetinin de belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler çeşitli küfler tarafından salgılanan ikincil metabolitler olup, insanlar ve hayvanlarda istenmeyen patolojik ve fizyolojik değişiklikler meydana getirirler. Mikotoksin terimi mantar anlamına gelen 'myco' ve zehir anlamındaki 'toxin' kelimelerinin birleştirilmesinden türemiştir. Bir takım küfler çeşitli gıda ürünlerini (olgunlaştırılmış peynir gibi) ve ilaçları (antibiyotikler) insanlara sunarlarken; öte yandan da mikotoksinler gibi zararlı bazı maddelerin de sentezinden sorumludurlar (Omaye, 2004). Küfler doğada serbest halde bol miktarda bulunurlar ve saprofilik özellikleri ile birçok organik maddeyi kullanarak büyüme ve çoğalmaları için gerekli yapıları diğer etmenlere ihtiyaç duymadan sentezleyebilirler. Bu özelliklerinden dolayı koruyucu tabakaları zarar görmüş olan birçok gıda maddeleri üzerinde rahatlıkla kolonize olabilirler. Günümüzde çeşitli küf cinsleri tarafından üretilen yaklaşık 300 mikotoksinin varlığı bilinmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar farklı mikotoksinlerin farklı organları etkilediğini ve akut toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olduğunu, bazılarının bu etkilerin birkaçını birden gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, mikotoksinler buğday, arpa, mısır ve pirinç gibi besin kaynaklarının yaygın kontaminantları olup, insan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Mikotoksinlerin çoğu *Aspergillus, Penicillium* ve *Fusarium* cinsleri tarafından sentezlenmektedir (Bennett ve Klich, 2003; Creppy, 2002; Omurtag, 2002). Mikotoksinler içinde en çok incelenen ve toksisite oluşturma potansiyeli en yüksek olanı, aflatoksin grubundan hepatotoksik ve karsinojenik özellikteki aflatoksin B1'dir. Son yıllardaki mikotoksin çalışmalarında üzerinde yoğunlaşılan diğer mikotoksin grupları ise okratoksinler, patulin, trikotesenler, zearalenon ve fumonisinlerdir.

2.1.1. Mikotoksin Oluşumuna Neden Olan Küfler

1800 sonları ve 1900 başlarında araştırmacılar küfler tarafından üretilen birçokikincil metabolitin farkına varmışlardır. 1928 yılında Alexander Fleming'inpenisilini keşfetmesiyle birlikte, bilim adamları antibiyotikler üzerine çalışmalarınıartırmışlardır. Bilim adamları bu araştırmaları yaparken bazı küf metabolitlerininhayvanlar üzerine toksik etki gösterdiğinin farkına varmasıyla, bilim dünyası insanlarve diğer hayvanlar üzerine hastalıklara neden olan mikotoksinlerle ilgili

ilk ipuçlarını elde etmişlerdir (Richard, 2007).Mikotoksin üreticileri olarak ön plana çıkan küf mantarları *Aspergillus*, *Penicillium, Fusarium* ve *Alternaria* türleridir. Tablo 2-1'de bu dört cinsin oluşturduğu başlıca mikotoksinler görülmektedir(Doyle ve ark. , 1997; Golob, 2007).

Tablo 2-1: Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler (Doyle ve ark. , 1997; Golob, 2007).

Aspergillus **toksinleri**	***Penicillium*** **toksinleri**	***Fusarium*** **toksinleri**	***Alternaria*** **toksinleri**
Aflatoksinler	Sitrinin	Zearalenon (F-2 toksin)	Alternariol
AFB1	Okratoksin A	Trikotesenler	Alternariolmono-metil-eter
AFB2	Sitreoviridin	Deoksinivalenol	Altertoksin
AFG1	Rubratoksin A	Nivalenol	Tenuazonikasit
AFG2	Rubratoksin B	Diasetoksisirpenol	
AFM1	Patulin	T-2 toksin	
AFM2	Penisilikasit	HT-2 toksin	
AFB2a	P-R (Pen. requeforti) toksin	Tremortin	
AFG2a	Luteosikrin	Fusarin-C	
AFB3	İzlanditoksin	Fumonisin B1	
Aspertoksin	Ksantosilin-X	Moniliformin	
Sitrinin	Siklopiazonikasit		
Sterigmatosistin	Sitromisetin		
Okratoksin A	Rugulosin		
Patulin	Ksantomegnin		
Penisilikasit	Rugulovasin A		
	Rugulovasin B		
	Verrukulotoksin		
	Emodin		

En önemli mikotoksin üreticilerinden *Alternaria* ve *Fusarium* cinsleri tarla küfleri, *Penicilium* ve *Aspergillus* ise depo küfleri sınıfına girmektedir. Her materyalin yapısına, bileşimine, içerdiği nem oranına, bulunduğu sıcaklık koşullarına göre ürünün üzerinde gelişen küf türleri, cinsleri, oranları oluşturdakları mikotoksin çeşitleri ve miktarları değişkenlik gösterirler.

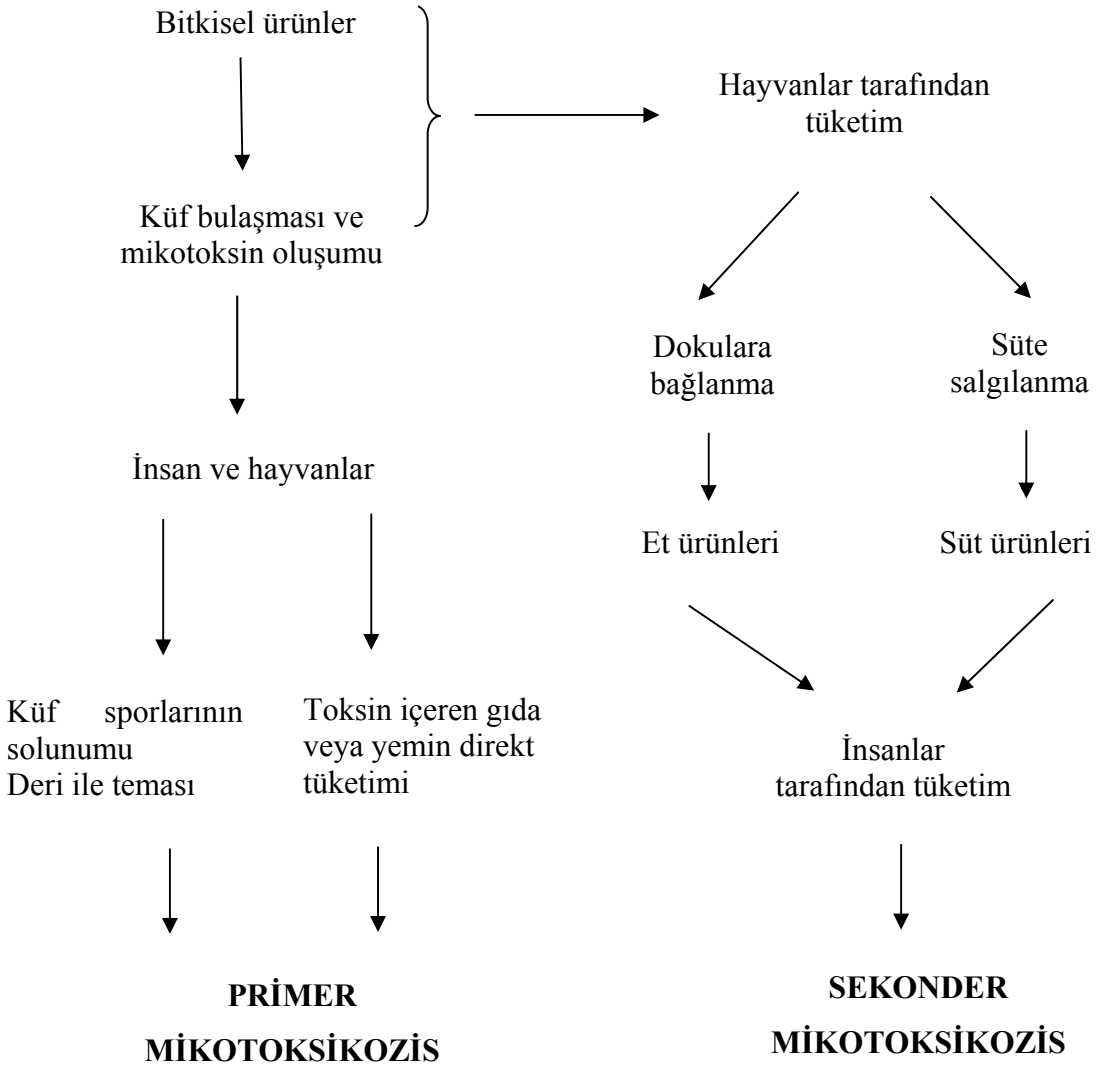
2.1.2. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Mikotoksin oluşumunu etkileyen en önemli faktörler çevresel faktörlerdir. Tarım ürünü veya gıdanın nem içeriği (sıcaklıkla beraber bağıl nem) küf mantarı sporlarının çimlenmesini ve misellerin gelişmesini sağlayarak toksin oluşumunu etkileyen en önemli faktördür. Mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler aşağıda gösterilmiştir (Bozoglu, 2003; Akdeniz, 2009, Tunail, 2000):

- ✓ Tarım ürünü ve gıdanın çeşidi,
- ✓ Ürünün yetiştirildiği ve depolandığı ortamın fiziksel koşulları (nem içeriği, sıcaklığı, pH'sı) (%70'den fazla nem ve 12–47 °C arasındaki sıcaklık mikotoksin üretimi için optimum koşulları sağlamaktadır),
- ✓ Ürünün olgunluk durumu, hasat işlemleri, depolama koşulları,
- ✓ Ortamda diğer yarışmacı mikroorganizmaların varlığı,
- ✓ Yetersiz gübreleme ve kuraklık (bitkilerdeki koruma sistemlerinin zarar görmesi sonucu küflerin bitkide kolayca kolonize olması),
- ✓ Mekanik işlemlerin ve böceklerin bitkilerdeki koruyucu yapıyı bozmalarıdır.

2.1.3. Mikotoksin Maruziyeti

İnsanların mikotoksinlere başlıca maruziyet kaynağı beslenmedir. Doğrudan kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi ya da kontamine yemler ile beslenen hayvanlardan elde edilen besinlerin tüketilmesiyle maruziyet gerçekleşir. İnsan ve hayvanlarda mikotoksinlerin sebep oldukları olaylar mikotoksin zehirlenmeleri "mikotoksikozis" olarak bilinmektedir. Bu durum, mikotoksinin kimyasal yapısına, toksik etkilerine maruz kalma süresine, kişinin yaş ve beslenme durumuna, kişinin maruz kaldığı diğer kimyasallarla toksinin kimyasal etkileşimine bağlı olarak ortaya çıkar. Doğrudan ve dolaylı yoldan mikotoksinlerin başlıca insanlara geçiş yolu Şekil 2-1'de gösterilmektedir. Temel olarak mikotoksin üretimi ve buna bağlı olarak yemeklerin ve gıda maddelerinin kontaminasyon dereceleri; substrat kompozisyonu ve yapısı, nem ve sıcaklık gibi faktörler değiştirilerek azaltılabilir. Mikotoksinlerin küfler tarafından sentezi genetik olarak düzenlenir ve aminoasit ve yağ asidi metabolizması ile ilişkilendirilir (Fink-Gremmels, 1999).



Şekil 2-1: Mikotoksinlerin insanlara geçiş yolu (Akdeniz, 2009).

2.1.4. Mikotoksinlerin Toksik Etkileri

İnsan sağlığı açısından risk oluşturan mikotoksinlerden en önemlisi *Aspergillus flavus*tarafından üretilen aflotoksin B1 (AFB1)'dir. İnsanda AFB1'in karaciğer kanserine sebep olduğu ortaya konmuştur. Karaciğer kanseri nedeni ile Çin ve Afrika'da yaklaşık olarak 250.000 ölüm gerçekleştiği ve nedeninin ise günlük yüksek miktarda (1,4 μg/kg) AFB1 alımı olduğu iddiaedilmiştir. Dokularında aflatoksin tespit

edilen çocukların aynı zamanda Kwashiorkor[1] ve Reye sendromundan şikayetçi olmaları, bu iki hastalığın ortaya çıkışında AFB1'in biretkisi olduğu şüphelerini uyandırmıştır (Richard ve ark., 2003).

İnsan sağlığına olumsuz etki eden diğer bir mikotoksin türü de okratoksin A (OTA)'dır. OTA, başta Balkan ülkelerinin (Bosna, Bulgaristan, Hırvatistan, Romanya ve Sırbistan) kırsal bölge insanlarında görülen "Balkan Endemik Nefropatisi" (BEN) olmak üzere, Mısır ve Tunus'da görülen ve etiyolojisi bilinmeyen nefropatiler ve böbrek tümörlerinden de sorumlu tutulmaktadır (Mally ve ark., 2007). Elde edilen epidemiyolojik bilgiler, BEN'nin OTA içeren yiyecek tüketimiyle bağlantılı olduğu sonucunu desteklemektedir. Fumonisinler ise; *Fusarium* cinsi küfler tarafından sentezlenir (Gelderblom ve ark., 1991). Güney Afrika ve Çin'in bazı bölgelerinde yapılan çalışmalarda; FB1 ve FB2'nin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu mısır yetişen bölgelerde özofagus kanserinin görülme sıklığının yüksek olduğu gösterilmiştir (Sydenham ve ark., 1990; Chu ve ark., 1994;Yoshizawa ve ark., 1994). Fumonisin içeren mısır ve bu mısırdan yapılan yemlerle beslenen atlarda beyin zarı iltihabı (equine leucoencephalomalacia, ELEM) (Marasas ve ark.,1988 ve Kellerman ve ark., 1990) ve domuzlarda akciğer ödemigeliştiği gösterilmiştir (Harrison ve ark., 1990). Tablo 2-2'de önemli mikotoksinler, üretici küfleri, kontamine olan ürünler ve toksik etkileri gösterilmiştir.

[1]Protein eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan kas erimesi

Tablo 2-2: Önemli mikotoksinler, üretici küfleri, kontamine olan ürünler ve toksik etkileri (Kotsonis and Burdock, 2013, p. 1338).

Mikotoksin	**Kaynak**	**Etkiler**	**Kontamine olan Gıdalar**
Aflatoksin B_1, B_2, G_1, G_2	*Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus*	Akut aflatoksikozis, karsinojenez	Mısır, yer fıstığı ve diğerleri
Aflatoksin M_1	*AFB_1 metaboliti*	Hepatotoksisite	Süt
Fumonisin B_1, B_2, B_3, B_4, A_1, A_2	*Fusarium verticillioides*	Böbrek ve karaciğer kanseri	Mısır
Trikotesenler (T2 toksin, Deoksinivalenol, Diasetoksisirpenol)	*Fusarium, Myrothecium*	Kan üzerine toksik etki,beyin kanaması, sinirsel düzensizlik, deri nekrozu, mide ve ince bağırsak kanaması, kusma, immün sistem baskılayıcı	Tahıl taneleri, mısır
Zearalenon	*Fusarium*	Östrojenik etki	Mısır, tahıl
Siklopiazonik asit	*Aspergillus, Penicillium*	Kas, karaciğer ve dalak toksisitesi	Peynir, tahıllar, fıstıklar
Kojik asit	*Aspergillus*	Hepatotoksik ?	Tahıllar, hayvan yemleri
3-Nitropropiyonik asit	*Arthrinium sacchari, Arthrinium saccharicola, Arthrinium phaespermum*	Merkezi sinir sistemi hasarı	Şekerkamışı
Sitreoviridin	*Penicillium citreoviride, Penicillium toxicarium*	Kalp ritmi bozuklukları	Pirinç
Sitokalasin E, B, F, H	*Aspergillus ve Penicillium*	Sitotoksisite	Mısır, tahıl taneleri
Sterigmatosistin	*Aspergillus versiolar*	Karsinojenez	Mısır
Penisilinik asit	*Penicillium cyclopium*	Nefrotoksisite, düşük yapma	Mısır, kuru fasulye, tahıllar
Rubratoksin A, B	*Penicillium rubrum*	Hepatotoksisite, teratojenik etki	Mısır
Patulin	*Penicillium patulum*	Karsinojenez, karaciğer hasarı	Elma ve elma ürünleri
Okratoksinler	*Aspergillus ochraceus, Aspergillus carbonarius, Penicillium verrucosum*	Endemik nefropati, karsinojenez	Mısır, fıstık, üzüm, yeşil kahve
Sitrinin	*Aspergillus ve*	Nefrotoksisite	Tahıl taneleri

	Penicillium		
Penitrem		Titreme, koordinasyon bozukluğu, kanlı ishal, ölüm	Küflü krem peynir, ingiliz cevizi, hamburger ekmeği, bira
Ergot alkaloidleri	*Claviceps purpurea*	Ergotizm	Tahıl

2.1.5. Mikotoksinlerin Dekontaminasyonu ve Zararlarının Azaltılması

Gıdalardan mikotoksinlerin dekontaminasyonu için birçok yaklaşım geliştirilmiştir (Halasz ve ark., 2009). Mikotoksinler ile kontamine olmuş gıda ve yemlerin zararlı etkilerinden korunmak amacıyla başlıca 3 prensip bulunmaktadır: 1) kontaminasyonun önlenmesi, 2) mikotoksin içeren gıda ve yemlerin dekontaminasyonu, 3) tüketilen gıdalardan gastrointestinal bölgede mikotoksin absorbsiyonunun önlenmesidir. Bu amaçlara yönelik olarak mikotoksinlerin dekontaminasyonu ve zararlarının azaltılması konusunda yapılan çalışmalarda fiziksel teknikler, doğal veya sentetikkaynaklı kimyasal maddeler ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır.

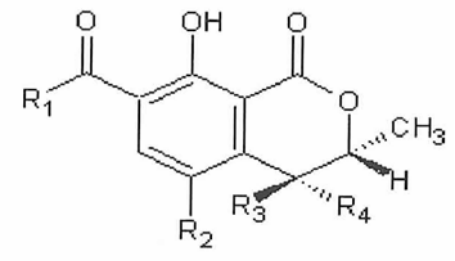
Fiziksel detoksifikasyon için uygulanan genel yöntemler; arındırma,mekanik sıralama ve dağılım, yıkama, yoğunluk farkının gözlenmesi, termalinaktivasyon, mikrodalga uygulamalarını da içeren radyasyon uygulamasıve çözücü ekstraksiyonu olarak sıralanabilir (Atasayar Sabuncuoğlu ve ark., 2008).

Mikotoksinlerin toksik olmayan ürünlere dönüştürülmesi amacıyla birçok ülkede alkali ve oksidatif ajanlar gibi farklı kimyasallar kullanımıyla ekonomik olarak kabul gören yöntemler de uygulanmıştır. Fakat bu uygulamalar mikotoksin konsantrasyonunu tamamen ya da tama yakın olarak azaltırken, gıdaların besin değerinin kaybolmasına ve bazı ürünler için de zararlı olmasına sebep olmaktadır. Ayrıca, Avrupa Birliği kimyasal uygulama metodlarına izin vermemektedir (Juodeikiene ve ark., 2012).

Daha sonraları, mikroorganizmalar ya da enzimler ile mikotoksinlerin biyolojik dekontaminayonu ve biyodegredasyonu yöntemleri kullanılmıştır. Mikotoksinlerin enzimatik olarak bir çok bakteri ve küf mantarı tarafından degrade edildiği gösterilmiştir (Bata ve Lasztity, 1999; Reddy ve ark., 2009; Patharajan ve ark., 2011;Styriak ve Concova, 2002; Pereira ve ark., 2010). Böylelikle, zararlı kimyasalların kullanılmamasıyla gıda ve yemlerin lezzeti ve de besin değeri bozulmadan mikotoksinlerin dekontaminasyonu sağlanmış olmaktadır.

2.2. Okratoksinler

Okratoksinler başta *Penicillium verrucosum*, ve *Aspergillus ochraceus* tarafından üretilmekte olup, düşük miktarda *Aspergillus niger'*in de okratoksinleri sentezleyebildiği rapor edilmiştir (Creppy, 2002). Okratoksinler kimyasal yapılarına göre A, B ve C olarak isimlendirilir. Fenilalanin ve dihidroizokumarinin peptid bağı ile birleşmesiyle oluşurlar. Şekil 2-2 ve Tablo 2-3'de okratoksinlerin kimyasal yapısı ve majör türevleri gösterilmiştir (Coronel ve ark., 2011).



Şekil 2-2: Okratoksinlerin kimyasal yapısı.

Tablo 2-3: R-sübstitüsyon gruplarına göre okratoksin türevleri.

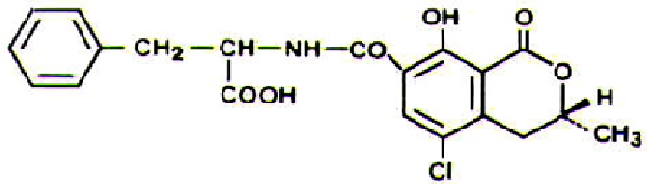
Genel İsim	Kısaltma	R1	R2	R3	R4
Okratoksin A	OTA	Fenilalanil	Cl	H	H
Okratoksin B	OTB	Fenilalanil	H	H	H
Okratoksin C	OTC	Fenilalanil etilester	Cl	H	H
4-R-hidroksi okratoksin A	4-R-OTA-OH	Fenilalanil	Cl	H	OH
4-S- hidroksiokratoksin A	4-S-OTA-OH	Fenilalanil	Cl	OH	H
Okratoksin α	OTα	OH	Cl	H	H
Okratoksin β	OTβ	OH	H	H	H

İçlerinde en yaygın bulunan ve toksik etkisi yüksek olan Okratoksin A (OTA)'dır. Dolayısıyla çalışmalar da OTA üzerine yoğunlaşmıştır (Van der Merwe ve ark., 1965; Marquardt ve ark., 1997). Aynı zamanda OTA, başta Balkan ülkelerinin (Bosna, Bulgaristan, Hırvatistan, Romanya ve Sırbistan) kırsal bölge insanlarında görülen "Balkan Endemik Nefropatisi" (BEN) olmak üzere, Mısır ve Tunus'da görülen ve etiyolojisi bilinmeyen nefropatiler ve böbrek tümörlerinden de sorumlu tutulmaktadır (Mally ve ark., 2007). Elde edilen epidemiyolojik bilgiler, BEN'nin OTA içeren yiyecek tüketimiyle bağlantılı olduğu sonucunu desteklemektedir.

OTA yaygın olarak tahıl ve tahıl ürünlerinde bulunmaktadır. Avrupa Birliği Komisyonu tarafından yapılan maruziyet değerlendirmesinde; Avrupa ülkelerinin toplam diyetinin %50'sini kapsayan tahıl ve tahıl ürünlerinin temel olarak OTA maruziyet kaynağı olduğu bildirilmiştir. (Avrupa Birliği Komisyonu, SCOOP, Task 3.2.7, 2002). Tahıl ve tahıl ürünleri dışında, OTA'nın kakao, kahve, çeşitli tahıllar, kuru meyveler, baharat, yağ, süt ve süt ürünleri, çay, bira, sirke, üzüm suyu, bebek maması ve şarap gibi çeşitli gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir (EFSA, 2006).

2.2.1. OTA'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

OTA, renksiz, kristalimsi, suda az çözünen, fakat sulu sodyum bikarbonatlı çözeltilerde çözünebilen, zayıf asidik özellikte bir bileşiktir.OTA'nın kimyasal yapısında fenilalanin, klorür ve hidroksil içeren dihidroizokumarin bileşikleri bulunur. Klorür içermeyen türevi okratoksin B, etilester türevi ise okratoksin C'dir. Bu iki okratoksin türevi gıdalarda görülseler de düşük konsantrasyonda bulunduklarından fazlaca önem taşımazlar (Tunail, 2000). OTA'nın moleküler formülü 1965 yılında Van der Merwe ve arkadaşları tarafından 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi 3,4-dihidro-3-metil izokumarin olarak açıklanmıştır (Van der Merwe ve ark., 1965; O'Callaghan J ve ark. 2003).OTA'nın kapalı formulü ise $C_{20}H_{18}O_6NCl$ ve moleküler ağırlığı 403,82'dir. OTA, dihidro-metil-izokumarin halka sisteminde 5. karbon üzerinde klor atomuna sahiptir, bu atom okratoksin B'de bulunmaz ve klor atomuna fenolik OH eklenmesi toksisiteyi arttırır. Fenilalanin ve dihidroizokumarin bileşikleri amid bağı ile bağlanırlar ve bu bağ ise ısıya ve hidrolize karşı çok dayanıklıdır (Frenettea, C. ve ark.,2008; Ringot, D. ve ark., 2006; Park, D.L. ve ark., 2000). Şekil 2-3'de OTA'nın kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2-3: OTA'nın kimyasal yapısı.

OTA genel olarak kararlı bir moleküldür ve tüketiciye sunulan gıda maddelerinin işlenme sürecinde herhangi bir değişime uğramadan varlığını sürdürebilir.

Bu süreçler kaynatma, fırınlama, kızartma ya da fermantasyon ve diğer bileşenleri yok edecek pH ve sıcaklıktır. OTA, pişirme ve ekmek yapımı sırasında kısmen bozulur. Fırında pişirme ve kızartma işlemlerinin toksin aktivitesini %20 oranında azalttığı görülmüştür (Berry, 1988; Puntaric ve ark., 2001).

2.2.2. OTA Oluşumuna Sebep olan Küfler

OTA coğrafik bölgelere ve ham maddelerin etkilenmesine göre farklı türlerde mantarlar tarafından oluşturulabilir. *Penicillium verrucosum*yaygın olarak bilinen bir depo mantarı olup, Kanada, kuzey doğu Avrupa ve güney Amerika'nın bazı bölgeleri gibi soğuk iklimlerde mısırlardaki OTA üreticisi olarak bilinir. Yanlızca 30°C ve daha düşük sıcaklık seviyelerinde aktivite gösterebilirler ve hatta *Penicillum* türlerinin 5°C gibi düşük sıcaklıklarda bile okratoksin ürettikleri bildirilmektedir (WHO, 1990). Buna zıt olarak *Aspergillus* türlerinin ise; yüksek sıcaklık ve nemin görüldüğü tropikal veya yarı tropikal iklimlerde kahve, kahve çekirdeği, kurutulmuş meyveler ve üzümden elde edilen meyve suları gibi materyallerde geliştiği görülmüştür. *Aspergillus* türleri arasındaorta sıcaklıklarda ve yüksek nemde aktivite gösteren *Aspergillus ochraceus* tahıllarda OTA üreten en dikkate değer tür olarak bilinir.

Aspergillus carbonarius siyah sporlara sahip olduğu için güneş ışığına ve güneşte bırakarak kurutma yöntemine oldukça dirençlidirler; bu yüzden yüksek sıcaklıklarda dahi gelişim gösterebilirler. *Aspergillus carbonarius*olgunlaşmış meyveler ile özdeşleşmiş durumdadır ve üzümlerdeki OTA'nın ana kaynağıdır. Ayrıca kurutulmuş asma meyveleri, şarap ve kahvelerde temel OTA üreten kaynaklarından biridir. Diğer bilinen bir tür olarak *Aspergillus niger* enfekte olmuş kahve çekirdekleri ve kuru asma meyvelerinde OTA üretiminden sorumlu önemli bir türdür (Centre for Food Safety, 2006).

2.2.3. OTA Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Gıda ve yemlerde OTA üretiminde etkili olan birçok faktör bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları; su aktivitesi (a_w), sıcaklık, substratın cinsi, ortamda rekabetçi mikrofloranın varlığı, ortamın pH'ı fungusun cinsi olarak sıralanabilir (Akdeniz, 2009; Gümüş, 2002; Bucheli ve ark., 2002; Bayman ve ark., 2002; Larsen ve ark., 2001). A_w değeri mikroorganizmaların kullanımına yarayan ve gıda içinde bağlı olmayan suyu ifade eder. Gıda içerisinde bulunan suyun mikroorganizmaların kullanımına açık

olmaması gerekir. Su aktivitesi değeri, substrattaki su buharı basıncının saf suyun buhar basıncına bölünmesiyle elde edilen bir parametredir. Optimum a_w'de ısı aralığı 4-31^oC'dir. Bu durumda Kanada ve İskandinavya gibi soğuk iklime sahip ülkelerde, OTA üretiminden *Penicillium*; Yugoslavya ve Avusturalya gibi sıcak iklime sahip bölgelerde ise OTA üretiminden %28-50 oranında *Aspergillus ochraceus* türlerinin sorumlu olduğunu ileri sürülmektedir (Soyöz, 2002; Pohland ve ark., 1992; Samson ve ark., 1988). OTA'nın üreyebilmesi için pH da önemli bir faktördür. Okratoksin üretebilen mantarların gelişebildikleri pH aralığı 3,9-9,1'dir. Ayrıca, küfler aeorobik mikroorganizmalar olduklarından oksijensiz ortamlarda gelişemezler.

2.2.4. OTA'nın Toksikokinetik Özellikleri

Oral yol ile alındıktan sonra, sıçan ve farelerde mide ve ince barsaklardan hızlı bir şekilde absorbe edilir. Absorbsiyon yüzdesi türler arasında farklılık gösterebilir (domuzda %66, sıçan ve tavşanda %56, tavukta %40). OTA kan dolaşımına geçtiğinde başlıca albumin ve diğer makromoleküller olmak üzere kan proteinlerine bağlanır. Bu durum türler arsında da farklılık gösterebilir. Hayvanlarda OTA ve metabolitlerinin doku ve plazmadaki konsantrasyonu tür, cinsiyet, doz, maruziyet yolu (direkt ya da gıda ile alımı; oral ya da intravenöz alımı), maruziyet süresi, diyet içeriğine ve hayvanın sağlık durumuna göre değişiklik gösterebilir (Coronel ve ark., 2011).

Tüm türlerde OTA'nın major metabolitinin klorlu dihidroizokumarin türevi olan okratoksin α olduğu gösterilmiştir. Okratoksin α ve OTA'nın diğer minör hidroksil metabolitlerinin OTA'dan daha az toksik olduğu bildirilmiştir (Bruinink ve ark., 1998).

Maruziyet yolu ve sıklığına bağlı olarak OTA'nın farklı oranlarda böbrek, karaciğer, kas, akciğer, kalp, barsak, testis, dalak, beyin, deri ve yağ dokularında biriktiği gösterilmiştir. Ana hedef doku olarak böbrek ve karaciğer gösterilmiş olup, bunları kas, akciğer ve kalp dokuları takip etmektedir. OTA'nın böbreklerden hücresel alımında spesifik taşıyıcıların rolünün olabileceği bildirilmiştir (JECFA, 2007). İnsan ve maymunlarda ana atılım yolağı böbreklerden eliminasyon olurken, sıçan ve farelerde safra ile atılım ana yolaktır. Yapılan bir çalışmada OTA'nın safra ve böbrekler yolu ile vücuttan çok yavaş atıldığını fakat metabolitlerinin ise daha hızlı bir oranda atıldığını göstermiştir. OTA ve metaboliti okratoksin α'nın feçesle de atıldığı bildirilmiştir (Li ve ark., 1997). Çeşitli çalışmalarda OTA'nın tavşan, sıçan ve ineklerde süte geçtiği gösterilmiş olup, OTA'nın insanlarda da süte geçtiği bildirilmiştir. OTA, geviş

getirmeyen hayvanlarda uzun yarılanma ömrüne sahiptir. OTA'nın yarılanma ömrü farelerde 1-1,5 gün, sıçanlarda 2-5 gün, domuzlarda 3-5 gün, maymunlarda yaklaşık 20 gün ve gönüllü insanlarda 35 gün olarak bildirilmiştir (JECFA, 2007).

2.2.5. OTA'nın Akut Toksik Etkileri

Çeşitli türlerde ve maruziyet yolları ile bulunan LD_{50} değerleri Tablo 2-4'de verilmiştir. Köpek ve domuzlar en duyarlı türler iken, sıçan ve fareler ise en az duyarlı türler olarak bildirilmiştir (JECFA, 2001).

Tablo 2-4: Çeşitli hayvan türlerinde OTA'nın veriliş şekillerine göre LD_{50} düzeyleri.

Hayvan Türü	**Uygulama yerine göre LD_{50} düzeyleri (mg/kg, vücut ağırlığı)**		
	Oral	Periton içi	Damar içi
Fare	46-58	22-40	26-34
Sıçan	20-30	13	13
Yeni doğan sıçan	3,9	-	-
Köpek	0,2	-	-
Domuz	1	-	-
Piliç	3,3	-	-

Akut zehirlenmelerde erken belirtiler olarak, birçok organda multifokal kanamalar, dalak, beyin, karaciğer, böbrek ve kalpte fibrin pıhtısı rapor edilmiştir. Ayrıca, nefroz, hepatik ve lemfatik nekroz ve ince bağırsak iltihabı gibi değişiklikler de bildirilmiştir (Albassam ve ark., 1987). İnsanlarda akut toksisitesi ile ilgili belgelenmiş herhangi bir ciddi vaka gözlenmediği bildirilmiştir.

2.2.6. OTA'nın Kronik Toksik Etkileri

OTA'nın çeşitli hayvan türlerinde nefrotoksik, hepatotoksik, teratojenik ve immunotoksik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, sıçan ve farelerde böbrek ve karaciğer tümörlerine sebep olan karsiojenik etkileri de gösterilmiştir. Yapılan araştırma verilerine dayanarak OTA'nın temel toksik etkimekanizması olarak, ATP azalmasına bağlı olarak mitokondriyel solunumuninhibisyonu, protein sentezinin azalmasına eşlik

eden tRNA sentezinin inhibisyonu, lipid peroksidasyonunun artması ileri sürülmektedir (Scientific Committee on Food, 1998).

OTA'nın kronik nefropatilerdeki rolü birçok memeli türünde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. OTA'nın birçok tarımsal hayvan türlerinde özellikle de domuzlarda ortaya çıkan nefropatilere sebep olduğu gösterilmiştir. Domuz ve kümes hayvanlarında görülen okratoksikoz böbreklerde proksimal tübülün dejenerasyonu, renal kortekste interstisyel fibroz, glomerülün hiyalinizasyonu ve tübüler epitelin atrofisi gibi patolojik değişikliklere sebep olur. Böbreklerin proksimal tübülleri OTA'nınsitotoksik ve karsinojenik etkilerini gösterdiğiana hedef bölgesidir. OTA'nın nefrotoksisitesinde cinsiyet ve türler arasında farklılık gösterilmiş olup, domuzların sıçan ve farelere göre daha hassas türler olduğu bildirilmiştir. OTA, başta Balkan ülkelerinin (Bulgaristan, Romanya ve eski Yugoslavya) kırsal bölge insanlarında görülen BEN olmak üzere, Mısır ve Tunus'da görülen ve etiyolojisi bilinmeyen nefropatiler ve böbrek tümörlerinden de sorumlu tutulmaktadır. Özellikle 35-55 yaş grubu kadınlarda daha sık görülen BEN'in semptomları zayıflık, iştahsızlık, belde kronik ağrılarla birlikte böbrek fonksiyon bozukluğu ve proteinüridir (Hall ve ark., 1967; Categnaro ve ark., 1991; Abid ve ark., 2003; Hassen ve ark., 2004; Wafa ve ark., 1998).

OTA'nın fare, sıçan, hamster ve tavuklarda teratojenik etkiye sebep olduğu aynı zamanda üreme sistemi üzerine de toksik etkiler gösterdiği belirtilmiştir. OTA immün sistemi baskılayıcı bir ajan olarak rapor edilmiş ve birçok memeli türünde immün sistem üzerine etkileri bildirilmiştir. OTA, protein biyosentezi ve makrofaj göçünün inhibisyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Creppy, ve ark., 1984).

OTA'nın hem dişi hem de erkek farelerde hepatoselüler tümörlere sebep olduğu, erkek farelerde ve dişi ve erkek sıçanlarda ise renal hücre adenom ve karsinomaları da gözlendiği rapor edilmiştir.Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) 1993 yılında OTA'yı insanlarda muhtemel karsinojen sınıfı olan Grup 2B grubu içerisine dahil etmiştir (IARC, 1993). Kemirgenlerde karsinojenik etki gösteren dozun nefrotoksik etki gösteren doz ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Memeli hücrelerinde *in vitro* olarak DNA hasarı, DNA tamiri ve kromozomal hasarlara sebep olduğu; aynı zamanda *in vivo* olarak farelerde de DNA hasarı ve kromozomal hasarlara sebep olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, genotoksik etki

mekanizmaları açıklanmamıştır ve direkt olarak DNA ile etkileşime girdiğine dair bir kanıt bulunmamaktadır.

Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Uzman Komitesi (Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives, JECFA) 1991 yılında OTA'nın domuzlarda böbrek toksisitesi temel alınarak en düşük advers etkinin gözlendiği değeri (lowest observed adversed effect level, LOAEL) 8000 ng/kg/gün vücut ağırlığı ve güvenlik faktörünü de 500 kabul ederek, kesin olmayan tolere edilebilir haftalık değeri (provisional tolarable weekly intake, PTWI) 112ng/kg vücut ağırlığı, yaklaşık olarak günlük değeri de 14 ng/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir. 1996 yılındaki JECFA değerlendirmesinde bu değer 100ng/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiş ve 2001 ve 2007 yıllarındaki JECFA değerlendirmelerinde de sabit kalmıştır (JECFA, 2007).

2.2.7. İnsanların OTA'ya Maruziyeti

İnsanların OTA'ya temel maruziyet kaynağı diyettir. Doğrudan kontamine olmuş gıda ürünlerinin tüketilmesi ya da kontamine yemler ile beslenen hayvanlardan elde edilen besinlerin tüketilmesiyle maruziyet gerçekleşir. Tahıl hangarlarındaki tozun solunmasıyla maruziyet pek görülmemektedir. İnsanların OTA'ya maruziyeti sütte veya kanda bulunan OTA seviyelerinin tespiti ile hesaplanabilir. 1995'te Avrupa Birliği'ne üye 13 ülkenin birlikte gerçekleştirdiği çalışma sonucunda insanlarda plazmada OTA seviyelerinin beslenme ile alınan gıdalardaki OTA seviyeleri ile benzer olduğu gösterilmiştir. Bu veriler OTA'nın temel kaynağının gıda maddelerinin kullanımı sonucu olduğunu göstermiştir (Avrupa Birliği Komisyonu, SCOOP, Task 3.2.2, 1997).

Çeşitli gıda ürünlerinde OTA seviyeleri ve gıdaların tüketim miktarına dayanılarak Avrupa Birliği üyesi popülasyonu için OTA'nın günlük alım miktarları hesaplanmıştır (Avrupa Birliği Komisyonu, SCOOP, Task 3.2.7, 2002; EFSA, 2006). Ortalama yetişkin tüketimi için OTA'nın ortalama günlük alım miktarı 2-3 ng/kg vücut ağırlığı olarak; haftalık ise 15-20 ng/kg vücut ağırlığı şeklinde belirlenmiştir. Yüksek oranda tüketiciler için haftalık alım miktarı ise 40-60 ng/kg vücut ağırlığı olarak bildirilmiştir. Ortalama plazma konsantrasyonu Norveç'te 0,18ng/mL; İspanya'da ise 1,19 ng/mL olarak bildirilmiştir. Hırvatistan, Kanada, Fas ve Lübnan'da da benzer OTA kan seviyeleri gösterilmiştir (EFSA, 2006). Türkiye'de ise Özçelik ve arkadaşlarının

yaptıkları bir çalışmada diyaliz ile tedavi edilen böbrek hastalarında ortalama kan OTA seviyeleri 2,1 ng/mL iken, kontrol gruplarında ise 0,44 ng/mL olarak bildirilmiştir (Ozcelik ve ark., 2001).

2.2.8. Gıda Ürünlerinde OTA ile İlgili Yasal Düzenlemeler

OTA'nın yakın zamana kadar sadece mısır, buğday, arpa, çavdar, yulaf, pirinç ve malt gibi tahıl ürünlerine bulaştığı bilinirken günümüzde kuru meyve, yer fıstığı, kahve, kakao, baharat, şarap, bira ve bazı hayvansal ürünlerde de rastlandığı bildirilmiştir.Bugün OTA, gıda maddelerinde ve hayvan yemlerinde bulunabilen en tehlikeli bulaşıcılardan biri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle birçok ülke, vatandaşlarını OTA bulaşmış gıda maddelerinin tüketimi sonucu ortaya çıkabilecek zararlardan korumak ve ihraç ettikleri ürünlerinin geri dönüşünü azaltabilmek için bir yandan yasal limitlerini belirlerken, öte yandan gıda maddelerindeki dağılımlarını ortaya koyacak tarama ve izleme programlarına yönelmektedir. Bu programlarla, hangi ürünlerde sorun olduğu belirlenmekte ve OTA oluşumunun kontrol edilmesine yönelik çalışmalara yön verecek veriler elde edilebilmektedir. Bu şekilde sistemli bir yaklaşımla gelişmiş ülkelerde sorun önemli ölçüde azaltılabilmiştir.

Avrupa Birliği'nin 2002 yılında yayınladığı komisyon direktifinde (EC 472/2002) gıda ürünlerinde OTA'nın maksimum seviyeleri belirlenmiştir (Avrupa Birliği Komisyonu, 2002). Direktife göre OTA'nın maksimum seviyelerini tahıllar ve tahıl taneleri için 5 μg/kg, insanların tüketimine sunulmuş işlenmiş tüm tahıl ürünleri için 3 μg/kg, kurutulmuş şarap meyveleri için 10 μg/kg olarak bildirilmiştir. Bebekler ve çocuklar için riskin çok daha fazla olduğu düşünülerek, 2004 yılında yayınlanan komisyon direktifinde (EC 683/2004) bebek mamaları, bebek ve çocuklar için işlenmiş tahıl bazlı gıdalar (0,5 μg/kg) ve özellikle bebekler için tıbbi amaçla kullanılan gıda ürünleri (0,5 μg/kg) de dahil edilmiştir (Avrupa Birliği Komisyonu, 2004). 2006 yılında yayınlanan komisyon direktifinde (EC 1881/2006) kavrulmuş ve öğütülmüş kahve çekirdeklerinde (5μg/kg), çözünebilir kahvede (10μg/kg) ve şarap ve bazı çeşitleri (2 μg/kg), üzüm suyu ve üzüm suyu konsantresi (2 μg/kg) için de limitler belirlenmiştir (Avrupa Birliği Komisyonu, 2006a). 2010 yılında bu direktif komisyon direktifi (EC, 105/2010) ile değiştirilerek baharatlar ve meyan kökü ektresi için de 80 μg/kg'a kadar maksimum limitler eklenmiştir (Avrupa Birliği Komisyonu, 2010).

Türkiye'de 1997 yılında yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde (23172 sayılı Resmi Gazete, 1997) mikotoksinlerden sadece aflatoksinler, patulin ve ergot alkaloidleri için limit değerlere yer verilirken, 2002 yılında yayımlanan "Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ" (Tebliğ No: 2002/63) ile üç üründe OTA için maksimum seviye bildirilmiştir (24885 sayılı Resmi Gazete, 2002). 26879 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan 17 Mayıs 2008 tarihli 2008/26 numaralı tebliğ ile de gıda maddelerindeki OTA'nın maksimum limitleri yeniden belirlenmiştir (26879 sayılı Resmi Gazete, 2008). Daha sonra, bu tebliğ yürürlükten kaldırılmış ve 29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan 'Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği' uygulanmaya başlanmış olup, bu yönetmeliğe göre OTA'nın gıdalarda belirlenen maksimum limitleri Tablo 2-5'de verilmiştir. 2011 yılındaki yönetmeliğe baharatlar ve meyan kökü için OTA limitleri eklenmiştir (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011).

Tablo 2-5: Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne göre gıdalarda belirlenen maksimum OTA limitleri (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011)

2.2.	**OKRATOKSİN A**	
2.2.1.	İşlenmemiş tahıllar	5,0
2.2.2.	İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3,0
2.2.3.	Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm)	10,0
2.2.4.	Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,0
2.2.5.	Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve	10,0
2.2.6.	Şarap ve meyve şarapları (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az % 15 olan şaraplar hariç)	2,0 ([13])
2.2.7.	Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli([14])	2,0 ([13])
2.2.8.	Üzüm suyu, konsantreden üretilen üzüm suyu, üzüm nektarı, üzüm şırası ve konsantreden üretilen üzüm şırası ([15]) (doğrudan insan tüketimine sunulan)	2,0 ([13])
2.2.9.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ([3]), ([9])	0,5
2.2.10.	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar ([11]), ([12])	0,5

2.2.11.	Baharatın aşağıdaki türleri için; — Kırmızıbiber (*Capsicum* spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) — Karabiber *(Piper* spp.) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) — Hintcevizi/Muskat (*Myristica fragrans*) — Zencefil (*Zingiber officinale)* — Zerdeçal (*Curcuma longa)* — Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	30,0 (30.6.2012 tarihine kadar) 15,0 (1.7.2012 tarihinden sonra)
2.2.12.	Meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra, G. inflate* ve diğer türler)	
2.2.12.1.	Meyan kökü (bitkisel infüsyon bileşeni olarak kullanılanlar)	20,0
2.2.12.2.	Meyan kökü ekstraktı ([16]) (özellikle alkolsüz içcek ve şekerleme üretiminde kullanılan)	80,0

2.3. Kırmızı Biberlerde Mikotoksin Sorunu

Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği'nde (Tebliğ No: 2013/12) pul kırmızı biber "*Capsicum* (*Solanaceae*) cinsine giren bitkilerin tam olgunlaşmış meyvelerinin tekniğine uygun olarak sapları alındıktan sonra kurutulup, su ile tavlanıp, farklı boyutlarda öğütülerek ya da parçalanarak pul haline getirilmiş, yemeklik bitkisel sıvı yağ ve yemeklik tuz karıştırılmış hali", kırmızı biber ise "*Capsicum* (*Solanaceae*) cinsine giren bitkilerin tam olgunlaşmış meyvelerinin tekniğine uygun olarak sapları alındıktan sonra kurutulup, öğütülmüş hali, şeklinde tanımlnmaktadır (28614 sayılı Resmi Gazete, 2013).

Kırmızı biber, Güneydoğu Anadolu Bölgesi başta olmak üzere, Türkiye'nin her bölgesinde yaygın olarak tüketilen ve aynı zamanda ülke ekonomisinde de önemli yeri olan bir üründür. Ancak, 1994 yılında Türkiye'den İsviçre ve Almanya'ya ihraç edilmek istenen kırmızı pul ve toz biberlerde limitlerin çok üzerinde aflatoksin bulunması nedeniyle ihracatta sıkıntılar yaşanmıştır. Böylelikle, kırmızıbiberlerde mikotoksin sorunu ortaya çıkmış ve halk sağlığı ve ekonomik yönden bu sorunun çözülmesinin gerekliliği de vurgulanmıştır (Demircioğlu ve Filazi, 2010).

Türkiye'de kırmızı biber üretimi oldukça ilkel sartlarda yapılmaktadır. Tarladan toplanan kırmızı biberler küçük parçalara ayrıldıktan sonra toprak üzerinde güneste kurutulur ve değirmenlerde toz haline getirilir. Daha sonra naylon ya da bez çuvallarda toptancılara satılmaktadır. Bundan dolayıdır ki kırmızı biberlerin topraktan toksikojenik mantar kontaminasyonuna ve de toksin oluşumuna oldukça açık bir ürün olduğu görülmektedir (Taydaş ve Aşkın, 1995; Dokuzlu, 2001). Buna karşın gelişmiş ülkelerde

kurutma işlemi özel cihazlar ile yapıldığından kontaminasyon en alt seviyede bulunmaktadır (Semple ve ark., 1989). Bu nedenle, mikotoksin problemi açısından kırmızı biberin kurutulması işleminin daha sağlıklı koşullarda yapılmasının sağlanması ve iyi tarım uygulamalarının hayata geçirilmesi ile bulaşma riskinin mümkün olduğu kadar azaltılması gerekmektedir (Şen ve Nas, 2010).

Türkiye'de kırmızı biberlerde mikotoksin varlığının araştırılması hem halk sağlığı hem de ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır. Türkiye'de yapılan çalışmalarda kırmızı biberlerde aflatoksin varlığı üzerine yoğunlaşılmış olup (Taydaş ve Aşkın, 1995; Yıldırım, 1996; Dokuzlu, 2001; Karagöz, 2001; Erdoğan, 2004; Kanbur 2006; Çoksöyler, 1999; Çolak ve ark., 2006; Aydın ve ark., 2007; Ardıç ve ark., 2008; Bircan ve ark., 2008; Demircioğlu ve Filazi, 2010, Set ve Erkmen, 2010; Yentür, 2010; Ozbey ve Kabak, 2012; Alpsoy ve ark., 2013;Karaaslan ve Arslanğray, 2015; Özkan ve ark., 2015),OTA varlğı açısından yayınlanmış sadece 1 çalışma mevcuttur (Ozbey ve Kabak, 2012). Bu araştırmalardan kırmızı pul biber yetiştirilmesi ve işlenmesi sırasında kurutma koşullarından kaynaklanan mikotoksin kontaminasyonunun çok geniş bir boyutta olduğu anlaşılmaktadır.

2.3.1. Kırmızı Biberlerde OTA ile ilgili Dünyada Yapılmış Çalışmalar

Dünyada kırmızı biberlerde yapılmış çalışmalar Tablo 2-6'da özetlenmiştir. Thirumala-Devi ve ark. (2000) Hindistan'da yapılan bir çalışmada analiz edilen 100 adet kurutulmuş acı kırmızı biber örneğinin 26'sında (%26) 10–120 μg/kg oranında OTA'ya rastlamıştır. Macaristan'da gerçekleştirilen bir çalışmada 70 adet öğütülmüş kırmızı biber örneğinin 18'inde (%25,7) 0,14-15,7 μg/kg oranında AFB1'e rastlanırken, 32'sinde (%45,7) 0,4-66,2 μg/kg oranında OTA bulunmuş olup, 5 adet acı kırmızı biber örneğinin 2'sinde (0,75-8,1 μg/kg) AFB1, 1'inde ise 2,1 μg/kg OTA'ya rastlanmıştır (Fazekas ve ark., 2005). Brezilya'da gerçekleştirilen bir çalışmada 70 adet toz kırmızı biber örneğinin 58'inde (%82,9) >LOD-7,3μg/kg oranında AFB1'e rastlanırken, 60 (%85,7) örnekte ise 0,24-97,2μg/kg oranında OTA bulunmuştur (Shundo ve ark., 2009). Santos ve arkadaşlarının (2010) İspanya'da yaptıkları bir çalışmada; 64 adet kırmızı biber örneğinin %59'unda AFB1, %98'inde OTA ve %39'unda zearalenon; 35 acı kırmızı biber örneğinin ise %40'ında AFB1, %100'ünde OTA, %46'sında zearalenon bulunmuştur. Bu çalışmada kırmızı biber örneklerinin %75'inde ve acı kırmızı biber

örneklerinin de %65'inde birden daha fazla mikotoksinin birarada bulunduğu belirtilmiştir.

Türkiye'de yayınlanmış kırmızı biberlerde aflatoksinler ve OTA varlığının araştırıldığı tek çalışmada ise; 24 adet acı kırmızı pul biber örneğinin 19'unda (%79,2) 0,13-11,45 µg/kg oranında AFB1'e rastlanırken, 18'inde (%75) 0,46-53,04 µg/kg oranında OTA'ya rastlanmış olup, 22 adet acı kırmızı toz biber örneğinin ise 14'ünde (63,6) 0,20-35,77 µg/kg oranında AFB1 ve 12'sinde (%54,5) 0,78-98,2 µg/kg oranında OTA bulunmuştur (Ozbey ve Kabak, 2012). Bu çalışmada acı kırmızı pul biber örneklerinin %62,5'inde ve acı kırmızı toz biber örneklerinin ise %40,9'unda AFB1 ve OTA'nın bir arada bulunduğu tespit edilmiştir. Jalili ve Jinap (2012) tarafından Malezya'da yapılan çalışmada; 80 adet acı kırmızı biber örneğinin 52'sinde (%65) 0,2-56,61 µg/kg oranında AFB1, 65'inde (%81,25) 0,2-101,24 µg/kg oranında OTA tespit edilmiştir. İtalya'da acı kırmızı biberlerde 30 adet örneğin 12'sinde (%40) 6,72-10,18 µg/kg oranında OTA bulunduğu rapor edilmiştir (Prelle ve ark., 2013). Skorkova ve ark. (2013) ise, Çek Cumhuriyeti'nde 12 adet acı kırmızı toz biberin %100'ünde 0,1-91,8 µg/kg, 12 adet tatlı kırmızı biberin %100'ünde 0,1-38,4 µg/kg ve 11 adet acı kırmızı biberin de %98'inde 0,1-32,7 µg/kg OTA verlığı tespit etmişlerdir.

Tablo 2-6: Dünyada kırmızı biberlerdeOTA ile ilgili yapılan çalışmalar

Örnek	**Örnek sayısı**	**OTA tespit edilen örnek sayısı**	**OTA (µg/kg)**	**Kaynak**
Kırmızı biber	5	0	-	El-Kady ve ark., 1995
Acı kırmızı toz biber	4	4	1,6-50,4	Patel ve ark.,1996
Kurutulmuş acı kırmızı biber	100	26	10–120	Thirumala-Devi ve ark.,2000
Öğütülmüş kırmızı biber	70	32	0,4–66,2	Fazekas ve ark.,2005
Acı kırmızı biber	5	1	2.1	
Kırmızı biber	17	6	≥ 10	Goryacheva ve ark.,2006
Öğütülmüş kırmızı biber	21	14	0,7-73,8	Hernandez Hierro ve ark.,2008
Toz kırmızı biber	70	60	0,24-97,2	Shundo ve ark.,2009
Kırmızı biber	64	62	<LOQ-281	Santos ve ark.,2010

Acı kırmızı biber	35	35	0,62-44,6	
Kırmızı biber	17	17	4,3-118,7	Santos ve ark.,2011
Acı kırmızı biber	11	11	4,3-19,1	
Tütsülenmiş kırmızı biber	4	4	9,0-474,7	
Acı kırmızı pul biber	24	18	0,46-53,04	Ozbey ve Kabak, 2012
Acı kırmızı toz biber	22	12	0,78-98,2	
Acı kırmızı biber	80	65	0,2-101,24	Jalili ve Jinap, 2012
Acı kırmızı biber	30	12	6,72-10,18	Prelle ve ark.,2013
Acı kırmızı toz biber	12	12	0,1-91,8	Skorkova ve ark.,2013
Tatlı kırmızı biber	12	12	0,1-38,4	
Acı kırmızı biber	12	11	0,1-32,7	

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

OTA standardı	Supelco, 46912
Etanol	Riedel-de Häen, 32221
Metanol	Riedel-de Häen, 34860
Asetonitril	Riedel-de Häen, 34888
Sodyum klorür	Lachema, 30423
Disodyum hidrojen fosfat	Riedel-de Häen,04274
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, 1.05101
Potasyum klorür	Riedel-de Häen, 12636
Hidroklorik asit	Riedel-de Häen, 07102
Tween 20	Sigma, P7949
Asetik asit	Merck, 1.00056.2500
Bor triflorürün metanoldeki%14'lük çözeltisi	Sigma, B1252
İmmunoaffinite kolon	Vicam,Ochratest^{TM} 13012

3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Buzdolabı (+4°C)	Arçelik,5231 NFY
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, 2041 D
Hassas terazi	Precisa,XB 220 A
Etüv	Nüve
Hassas terazi	Mettler, H20

Mobil faz filtre sistemi	Phenomenex
pH metre	Hanna, HI 1131 B
Milli Q su cihazı	Millipore, Milli Q Gradient
Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1200
Su banyosu	Memmert, WB14
Vakum pompası	Speedivac,ES 35
Vorteks	Ika, NC 28405
Santrifüj aleti	Hettich, Universal 32R
Laboratuar blenderi	Waring commercial
Vakum manifold cihazı	Varian
Ultrasonik banyo	Transsonic, 460 H
Blok ısıtıcı	Lab-line
Azot tüpü	Habaş

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Sistemi

HPLC sistemi	Shimadzu, LC-20A
Sistem kontrol ünitesi	Shimadzu, CBM-20A
Pompa ünitesi	Shimadzu, LC-20AD
Floresans dedektör	Shimadzu, RF-10AXL
Degaz ünitesi	Shimadzu, DGU-20A5
Otomatik numune örnekleyici	Shimadzu, SIL-20AHT
Kolon fırını	Shimadzu, CTO-10AS
Rezervuar tablası	Shimadzu
Yazılım programı	Shimadzu, LC-Solution
Bilgisayar ve yazıcı	Xerox, HP L1706

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Enjektör (10 mL)	Set inject
Falkon tüp (15 mL; 50 mL)	Citotest
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner bio-one
Mikrotüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Polipropilen tüp (3 mL)	Greiner bio-one
Schott şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)	Isolab
Pipet ucu (0,5-10 µL; 2-20µL; 20-200 µL;100-1000 µL)	Nest
Mobilfaz süzme filtresi (0,2 µm)	Sartorius
Siyah bantlı filtre kağıdı 110 mm	Schleicher&Schüll 300 010

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. OTA Standart Çözeltileri

OTA stok çözeltisi: 50 ng/µL konsantrasyonunda ve benzen:asetik asit (99:1) çözeltisi içinde hazır olarak satın alınan OTA standart çözeltisi -20°C'de muhafaza edildi. OTA ara stok ve çalışma standart çözeltileri OchraTest WB^{TM} (Vicam) test protokolüne uygun olarak hazırlandı.

1 ng/µL OTA ara stok standart çözeltisi:20 µL OTA standart çözeltisine (50 ng/µL) 980 µL etanol eklendi ve 1 ng/µL konsantrasyonda olacak şekilde OTA ara stok standart çözeltisi hazırlandı.

0,1 ng/µL OTA ara stok standart çözeltisi: 100 µL OTA ara stok çözeltisine (1 ng/µL) 900 µL etanol eklendi ve 0,1 ng/µL konsantrasyonda ikinci ara stok standart çözeltisi hazırlandı.

OTA çalışma standard çözeltileri: Hazırlanan ara stok standart çözeltileri metanol ile seyreltilerek 1 g örneğe eşdeğer olacak şekilde 0,05-40 µg/kg konsantrasyon aralığında çalışma standart çözeltileri hazırlandı. Daha sonra çalışma standart çözeltileri 1/2 oranında su ile seyreltildi ve -20°C'de cam vial içerisinde muhafaza edildi. Çalışma standart çözeltilerinin analizden önce sıcaklığının oda koşullarına gelmesi sağlandı.

3.4.2. Fosfat Tamponu

8 g Sodyum klorür, 1,2 g disodyumhidrojen fosfat, 0,2 g potasyumdihidrojen fosfat ve 0,2 g potasyum klorür tartılıp, 990 mL Milli Q sudaçözüldü. %37'lik hidroklorik asit ile pH 7'e ayarlandı ve Milli Q su ile hacmi 1 L'ye tamamlandı.

Fosfat tampon-%0,01 Tween 20 yıkama tamponu

1000 mL Fosfat tamponu üzerine 0,1 mL tween 20 eklenerek hazırlanır.

3.4.3. Mobil Faz Çözeltisi

Milli Q su, asetonitril ve asetik asit, 99:99:2 (hacim/hacim) oranında hazırlandı ve ultrasonik su banyosunda degaze edildi.

3.5. Örneklerin Hazırlanması

3.5.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada İstanbul'un değişik semtlerindeki çeşitli pazar ve marketlerden temin edilen44 adet markasız ve açıkta satılan kırmızı pul biber örnekleri ve 31 adet markalı ve kapalı ambalajda satılan kırmızı pul biber örnekleri kullanıldı. Örnekler deney gününe kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.5.2. Örneklerin Ekstraksiyonu ve İmmünoafinite Kolon ile Temizleme

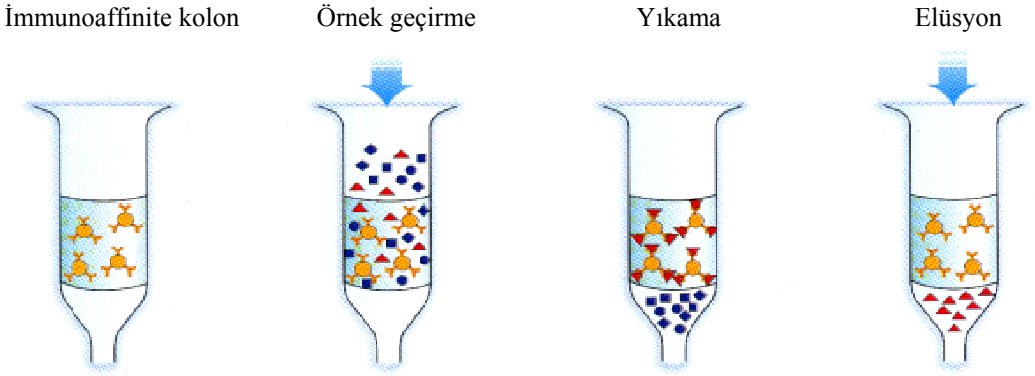
Kırmızı pul biberlerde OTA ekstraksiyonuVicam tarafından sağlanan OchraTest WB^{TM} immünoafinite kolonlar (OTA'ya özel spesifik antikorlar içeren) ile kullanım talimatları uygulanarak aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Temin edilen immünoafinite kolonları $^{+}$4°C'de muhafaza edildi.

Örneklerin ekstraksiyonu

1. 25 gr örnek, 100 mL (asetonitril:su, 60:40, hacim/hacim) ileblenderda 1 dakika süre ile yüksek devirde homojenize edildi.
2. Örnek ekstresi siyah bantlı süzgeç kağıdından 50 mL'lik falkon tüpe süzüldükten sonra, süzüntünün 10 mL'si 40 mL fosfat tamponu ile seyreltildi ve 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Ekstrenin yüksek organik çözücü içeriğine immunoaffinite kolonların dayanıklı olmamasından dolayı elde edilen süzüntünün seyreltilmesi gerekmektedir.

İmmunoafinite kolon ile temizleme

İmmünoafinite kolon ile temizleme işlemi Şekil 3-1'de gösterilmiştir.



Şekil 3-1: İmmunoaffinite kolonda temizleme işlemi

1. İmmünoafinite kolonlar içeriseinde hazır bulunan koşullandırma çözeltisi kolondan geçirildi.
2. Elde edilen ekstrenin 20 mL'si 1 damla/saniye hızla kolondan geçirildi.
3. Ekstre kolondan geçirildikten sonra, kolon 10 mL %0,01 oranında tween 20 içeren fosfat tamponu ve 10 mL su ile yıkandı.
4. Elüsyondan önce kolondan suyun tamamıyla temizlenmesi için hava geçirildi.
5. Spesifik antikorlara bağlı halde bulunan OTA, kolondan 1,5 mL elüsyon çözeltisi (metanol:asetik asit, 98:2, hacim/hacim) ile 1 damla/saniye hızla elüe edildi.
6. Eluata 1,5 mL su ilave edildi, vortekste karıştırıldıktan sonra karışımın 100 µL'si HPLC'ye uygulandı.

3.6. OTA'nın Fluoresans Dedektör Donanımlı HPLC ile Analizi

OTA'nın kırmızı pul biberlerde analizi OchraTest WB^{TM} (Vicam) test protokolüne uygun olarak fluoresans dedektör donanımlı HPLC cihazında gerçekleştirildi. OTA analizi için optimum kromatografik çalışma koşulları Tablo 3-1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: OTA analizi için optimum kromatografik çalışma koşulları.

Kolon	Teknokroma Mediterraneasea, C_{18}, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm, 100 A
Koruyucu kolon	Phenomenex, C_{18},4mm x 3.0 mm, 5µm
Mobil Faz	Su:asetonitril:asetik asit(99:99:2, hacim/hacim), izokratik sistem
Akış Hızı	1 mL/dakika
Enjeksiyon Hacmi	100µL
Basınç	Minimum 0 bar, Maksimum 300 bar
Dedektör özellikleri	Fluoresans dedektör, Eksitasyon dalga boyu:333 nm, Emisyon dalga boyu:460 nm
Alıkonma Zamanı	10,5-11,5 dakika

3.7. Yöntemin Validasyonu

3.7.1. Seçicilik

Örneklerden kaynaklanabilecek olası girişimlerin incelenmesi amacıyla OTA içermeyen boş kırmızı pul biber örnekleri ve OTA katım yapılmış örnekleri HPLC ile analiz edildi. Kromatogramlar incelenerek boş örnekte OTA piki ile yakın alıkonma zamanlarında matriksten ve çözücüden kaynaklanan herhangi bir girişim olmadığı incelendi.

3.7.2. Doğrusallık

OTA standart çözeltilerine karşı dedektörün cevabının belli konsantrasyonaralığındaki doğrusallığını belirlemek amacıyla 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 40 µg/kg'lik konsantrasyonlarda OTA standard çözeltilerinden 4'er adet hazırlandı. Her çözeltiden 3'er kez enjekte edildi. Kromatogramlarda standartlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak y=ax+b formülüne göre kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında kullanılan ortalama pik alanları, standard sapma (SD) ve relatif standard sapma (RSD, %) değerleri hesaplandı.

3.7.3. Doğruluk

Geri kazanım çalışmaları

Yapılan analiz sonucuOTA içermediği tespit edilen boş kırmızı pul biber örneklerine OTA standart çözeltisinden örnekteki miktarı 0,05; 0,5; 2; 5; 10; 20; 40µg/kgkonsantrasyonlarda olacak şekilde katım yapıldı. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve Bölüm 3.5.2'de belirtilen koşullarda çalışmaya devam edildi. Her konsantrasyon için 4 kezçalışıldı ve her birinden 3'er kez enjekte edildi. Katım

yapılmamış kırmızı boş biber örneğiyle paralel çalışılarak matriksten ilerigelebilecek piklerin varlığı da kontrol edildi. Kromatogramlarda OTA'ya karşılık gelen pik alanları kullanılarak y=ax+b formülüne göre bir kalibrasyon eğrisi çizildi. Geri kazanım oranları, SD ve RSD (%) değerleri hesaplandı.

3.7.4. Kesinlik

Gün içi tekrarlanabilirlik

OTA içermediği tespit edilen boş kırmızı pul biber örneklerine OTA standart çözeltisinden örnekteki miktarı 0,5; 2; 5; 10; 20µg/kg konsantrasyonlarda olacak şekilde katım yapıldı. Bölüm 3.5.2'de belirtilen koşullarda çalışmaya devam edildi. Aynı gün içinde her konsantrasyon için 4 kez çalışıldı ve gün içinde her birinden 3'er kez enjekte edildi.Kromatogramlarda OTA'ya karşılık gelen pik alanlarının ortalaması alındı ve SD veRSD (%) değerleri hesaplandı.

Günler arası tekrarlanabilirlik

OTA içermediği tespit edilen boş kırmızı pul biber örneklerine OTA standart çözeltisinden örnekteki miktarı 0,5; 2; 5; 10; 20µg/kg konsantrasyonlarda olacak şekilde katım yapıldı. Bölüm 3.5.2'de belirtilen koşullarda çalışmaya devam edildi. Aynı gün içinde her konsantrasyon için 1 kez çalışıldı ve her birinden 3'er kez enjekte edildi. Bu işlem birbirini takip eden 4 gün boyunca ve her defasındayeni çözeltilerle çalışılmak koşuluyla tekrarlandı. Kromatogramlarda OTA'ya karşılık gelen pik alanlarının ortalaması alındı ve SD veRSD (%) değerleri hesaplandı.

3.7.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için OTA katımı yapılmış kırmızı biber örneklerinde "teşhis edilebilir en düşük OTA konsantrasyonu (LOD)"(gürültü/sinyal oranı = 3) ve kalibrasyon eğrisinde verilen en düşük konsantrasyon değeri olan"tayin edilebilir en düşük OTA konsantrasyonu (LOQ)"(gürültü/sinyal oranı = 10) cihaz üzerinde hesaplandı.

3.7.6. Kararlılık

OTA'nın metanol/su ve örneklerdeki kararlılığı +25°C, +4°C ve -20°C sıcaklıklarında 1., 2., 3., 5. ve 20. günlerde izlendi. Ölçüm günü ara stok OTA çözeltisinden taze örnekler hazırlanarak alan değerlerindeki değişim ölçüldü.

3.7.7. Konfirmasyon

OTA'nın konfirmasyonu metil esterine dönüştürülerekOchraTest WB^{TM} (Vicam) test protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. 0,4 mL kırmızı pul biber ekstresi ve 0,4 mL OTA standardı kuruluğa kadar uçuruldu. Üzerine 0,5 mL bor triflorürün metanoldeki %14'lük çözeltisinden ilave edildi. Karışım 15 dakika 50-60 °C de su banyosunda ısıtıldıve soğutulduktan sonra azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu. Artık daha sonra 0,4 mL mobil fazda çözüldü ve vortekste karıştırıldı. Türevlendirilmiş ekstrenin analizi aynı çalışma koşullarında HPLC'de gerçekleştirildi. OTA-metil esterinin alıkonma zamanının OTA pikinden 20 dakika sonra olduğu tespit edildi (Zimmerli ve Dick, 1995).

3.8. Örneklerin Analizi

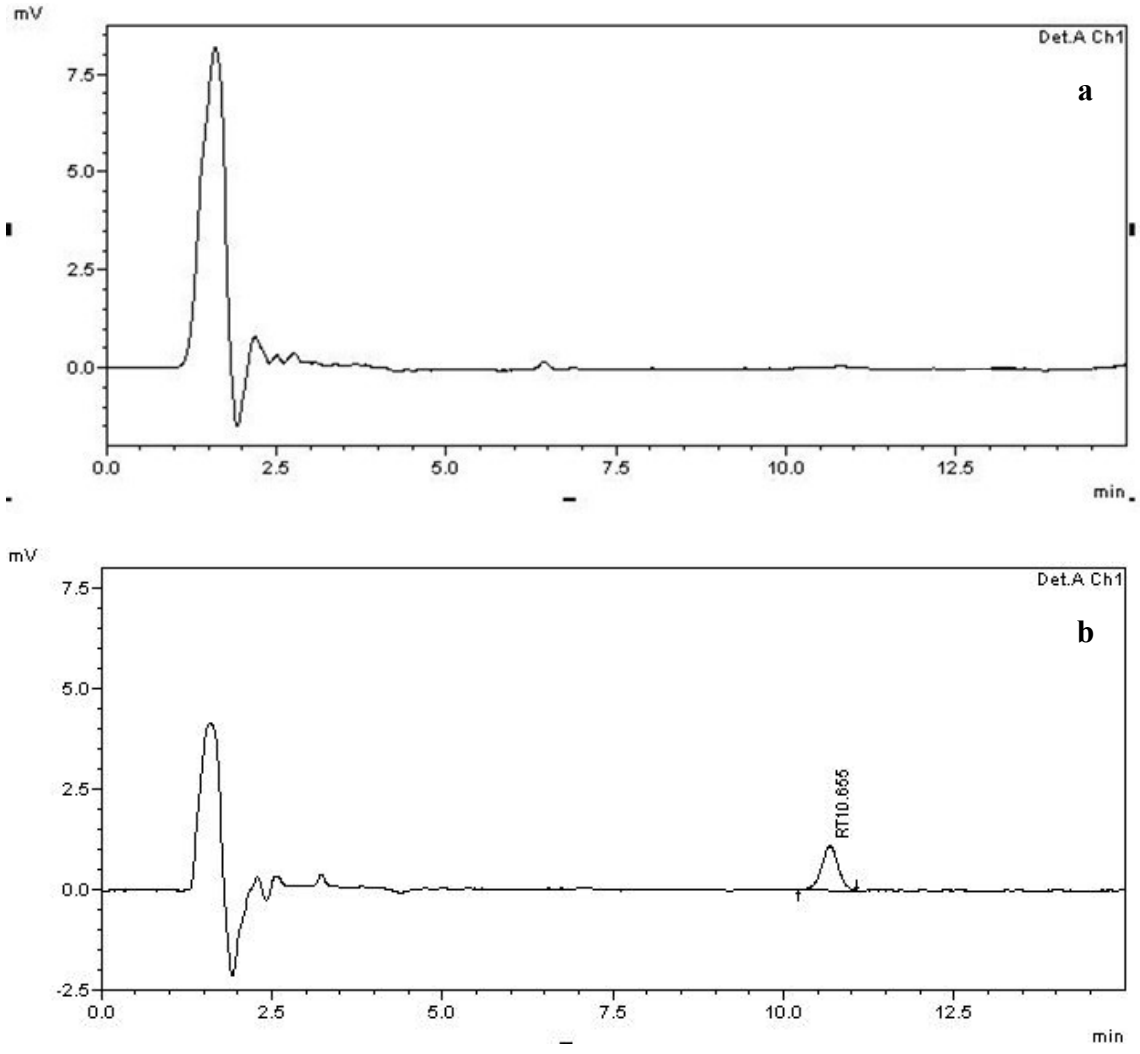
Çalışmada İstanbul'un değişik semtlerindeki çeşitli pazar ve marketlerden temin edilen44 adet markasız ve açıkta satılan kırmızı pul biber örnekleri ve 31 adet markalı ve kapalı ambalajda satılan kırmızı pul biber örnekleri Bölüm 3.5.2 ve 3.6'ya göre çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Türk Gıda Kodeksi'nde kabul edilen maksimum OTA limitlerine göre değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Yöntemin Validasyonu

4.1.1. Seçicilik

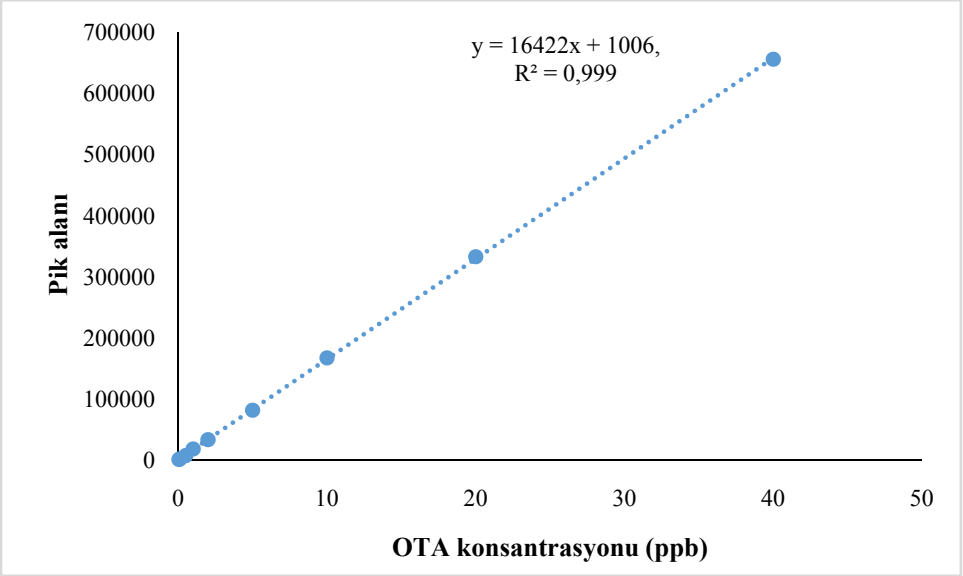
Bölüm 3.7.1'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen OTA içermeyen boş kırmızı pul biber örnekleri ve OTA katım yapılmış örneklerine ait kromatogramlar incelenmiş ve boş örneklerde OTA piki ile yakın alıkonma zamanlarında matriksten ve çözücüden kaynaklanan herhangi bir girişim olmadığı görülmüştür. Şekil 4.1'de boş ve 2 μg/kg konsantrasyonda OTA ile katım yapılmış pul biber örneklerine ait kromatogramlar verilmiştir.



Şekil 4-1: a) OTA tespit edilmeyen kırmızı biber örneğine ait kromatogram, b) 2μg/kg konsantrasyonda olacak şekilde OTA ile katım yapılmış kırmızı pul biber örneğine ait kromatogram.

4.1.2. Doğrusallık

Bölüm 3.7.2'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen 0,5-40 µg/kg konsantrasyon aralığında OTA standardına ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4-2'de ve bu eğrinin hazırlanmasında kullanılan ortalama pik alanları ve SD ve RSD (%)değerleri de Tablo 4-1'de gösterilmektedir.



Şekil 4-2: OTA standardına ait kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4-1: OTA standartlarına ait kalibrasyon eğrisinin ortalama pik alanları, SD ve RSD (%) değerleri (n=4).

OTA Konsantrasyonu (µg/kg)	Ortalama pik alanı	SD	RSD (%)
0,05	1165	155,53	13,35
0,1	2152	278,25	12,93
0,5	7565	966,05	12,77
1	18479	2333,89	12,63
2	33538	3085,50	9,20
5	81685	3920,88	4,80
10	167425	3817,29	2,28
20	332756	22361,20	6,72
40	655852	22954,82	3,50

4.1.3. Doğruluk

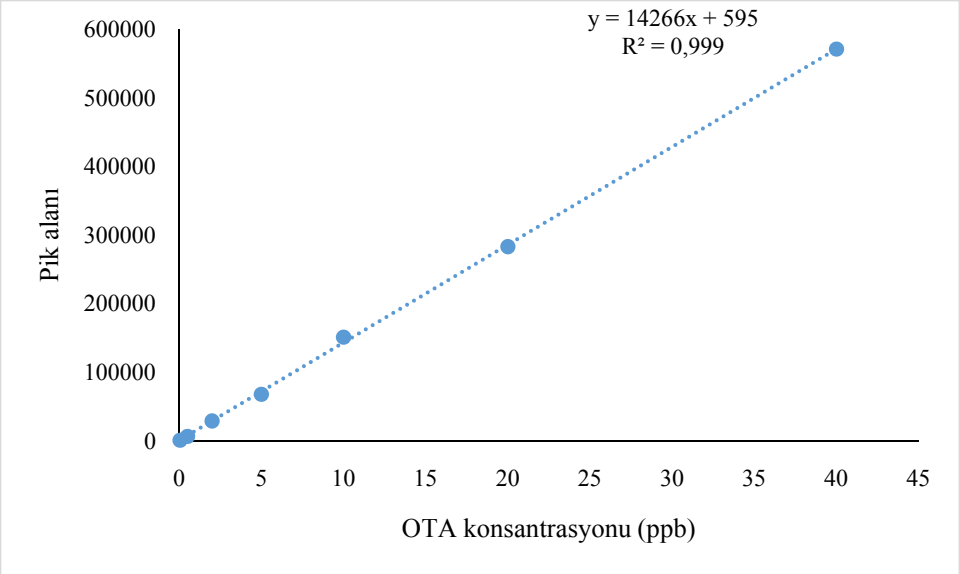
Geri kazanım çalışmaları

Bölüm 3.7.3'de anlatıldığı şekilde OTA standart çözeltisinden örnekteki miktarı 0,05; 0,5; 2; 5; 10; 20; 40 µg/kg konsantrasyonlarda olacak şekilde kırmızı pul biber örneklerine yapılan katım sonucu elde edilen geri kazanım (%), SD ve RSD (%) değerleri Tablo 4-2'de verildi.

Tablo 4-2: OTA'nın kırmızı pul biber örneklerine yapılan katım sonucu elde edilen geri kazanım (%), SD ve RSD (%) değerleri (n=4).

OTA katım miktarı (ppb)	Ortalama geri kazanım (%) ± SD	RSD (%)
0,05	93,13 ± 9,1	9,77
0.5	88,41 ± 7,2	8,10
2	86,90 ± 7,8	9,0
5	83,32 ± 6,1	7,30
10	90,34 ± 7,3	8,10
20	85,09 ± 5,8	6,80
40	87,08 ± 4,2	4,83

Katım sonucu elde edilen değerler ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi Şekil 4-3'de ve bu eğrinin hazırlanmasında kullanılan ortalama pik alanları, SD ve RSD (%) değerleri de Tablo 4-3'de gösterilmektedir.



Şekil 4-3: OTA'nın kırmızı pul biber örneklerine yapılan katım sonucu elde edilenelde edilen kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4-3: OTA'nın kırmızı pul biber örneklerine yapılan katım sonucu hazırlanan kalibrasyon eğrisine ait ortalama pik alanları, SD ve RSD (%) değerleri(n=4).

OTA katım miktarı (µg/kg)	Ortalama pik alanı	SD	RSD (%)
0,05	1085	106	9,77
0,5	6687	541,647	8,1
2	29144	2622,96	9,0
5	68059	4968,307	7,3
10	151245	12235,72	8,09
20	283158	19254,74	6,8
40	571105	27584,37	4,83

OTA için Analiz Metodu Performans Kriterleri:

Türk Gıda Kodeksi, "Gıda Maddelerinde Mikotoksinlerin Seviyesinin Resmi Kontrolü için Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri" Tebliğinde (Tebliğ No: 2011/32) (28026 sayılı Resmi Gazete, 2011) ve Avrupa Birliği Komisyonu Direktifinde (EC, 401/2006) (Avrupa Birliği Komisyonu, 2006b) yer alan OTA için analiz metodu performanstesti ile ilgili parametrelere uygun olduğu görülmüştür (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Gıda maddelerinde mikotoksinlerin seviyesinin resmi kontrolü için analiz metodu kriterleri (28026 sayılı Resmi Gazete).

Limit (µg/kg)	Okratoksin A		
	RSD_r (%)	RSD_R (%)	Geri Alma (%)
<1	≤40	≤60	50 – 120
1 – 10	≤20	≤30	70 – 110

r = Tekrarlanabilirlik, R = Laboratuvarlararası yeniden yapılabilirlik

4.1.4. Kesinlik

Gün içi ve Günler arası Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.7.4'de anlatıldığı şekilde çalışılarak OTA standart çözeltisinden örnekteki miktarı 0,5; 2; 5; 10; 20µg/kg konsantrasyonlarda olacak şekilde kırmızı pul biber örneklerine katım yapılmasıyla elde edilen gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları Tablo 4-5'degösterilmektedir.

Tablo 4-5: Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları (n=4).

Gün içi tekrarlanabilirlik			Günler arası tekrarlanabilirlik		
OTA konsantrasyonu (µg/kg)			OTA konsantrasyonu (µg/kg)		
Katım yapılan konsantrasyon	Bulunan konsantrasyon (ortalama ± SD)	RSD (%)	Katım yapılan konsantrasyon	Bulunan konsantrasyon (ortalama ± SD)	RSD (%)
0,5	0,51 ± 0,05	9,1	0,5	0,44 ± 0,04	8,1
2	1,96 ± 0,2	7,8	2	1,74 ± 0,2	9,0
5	4,85 ± 0,3	6,3	5	4,17 ± 0,3	7,3
10	9,48 ± 0,8	8,7	10	9,03 ± 0,7	8,1
20	19,21 ± 1,3	6,6	20	17,02 ± 1,2	6,8

4.1.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

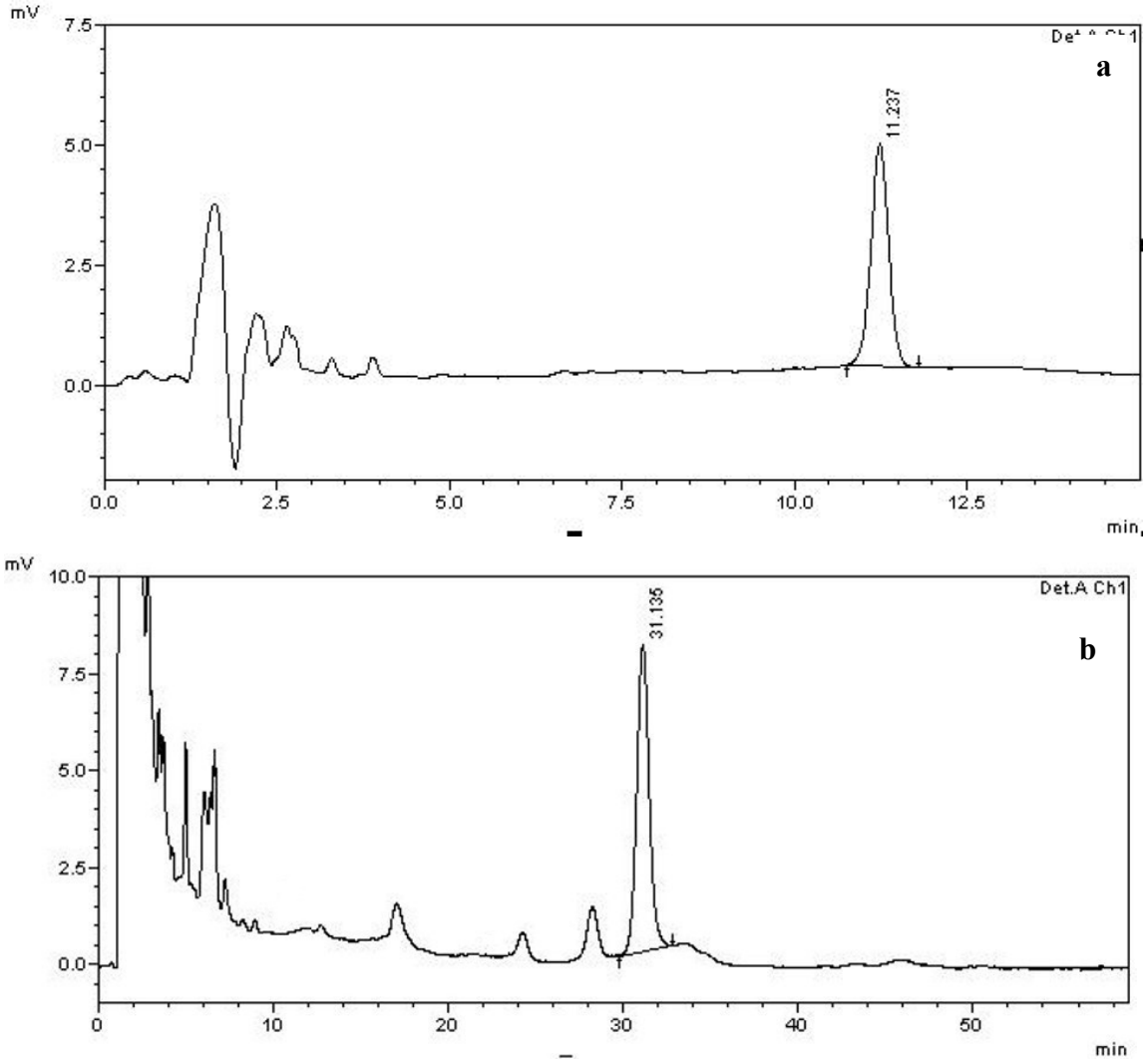
Bölüm 3.7.5'de anlatıldığı şekilde yapılan kırmızı pul biber örneklerine katım deneyleri sonucunda OTA için LOD değeri 0,015µg/kg; LOQ değeri ise 0,05 µg/kg olarak belirlendi.

4.1.6. Kararlılık

OTA'nın metanol/su ve örneklerdeki kararlılığı +25°C, +4°C ve -20°C sıcaklıklarında 1., 2., 3., 5. ve 20. günlerde izlendi. Ara stok OTA çözeltisinden taze olarak hazırlanan örneklerin ölçülmesiyle elde edilen alan değerlerinde bir değişim olmadığı görüldü.

4.1.7. Konfirmasyon

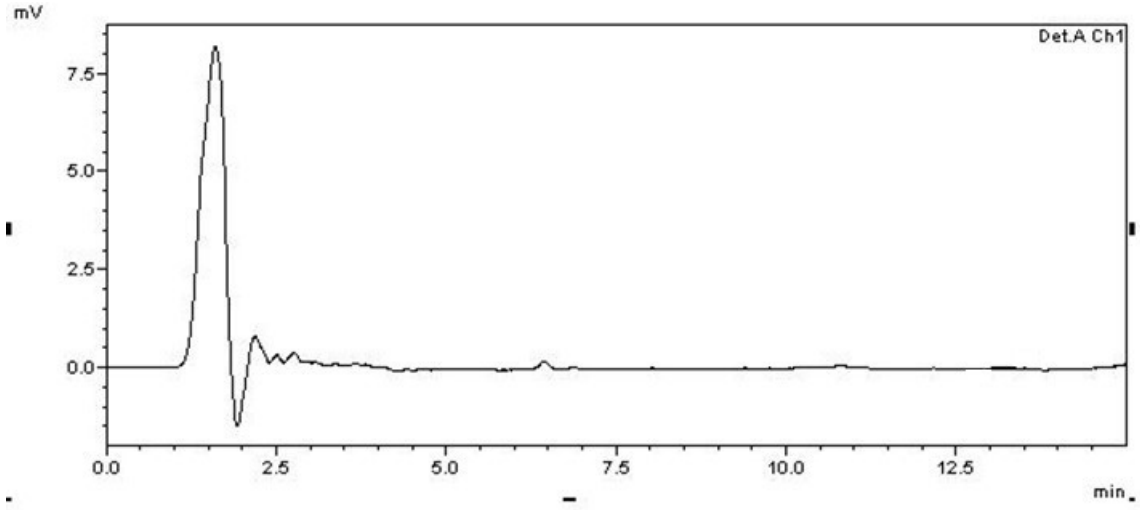
Bölüm 3.7.7'deanlatıldığı şekilde hazırlanan OTA standartına ve OTA-metil esterine ait kromatogramlar Şekil 4-4'de gösterilmektedir.



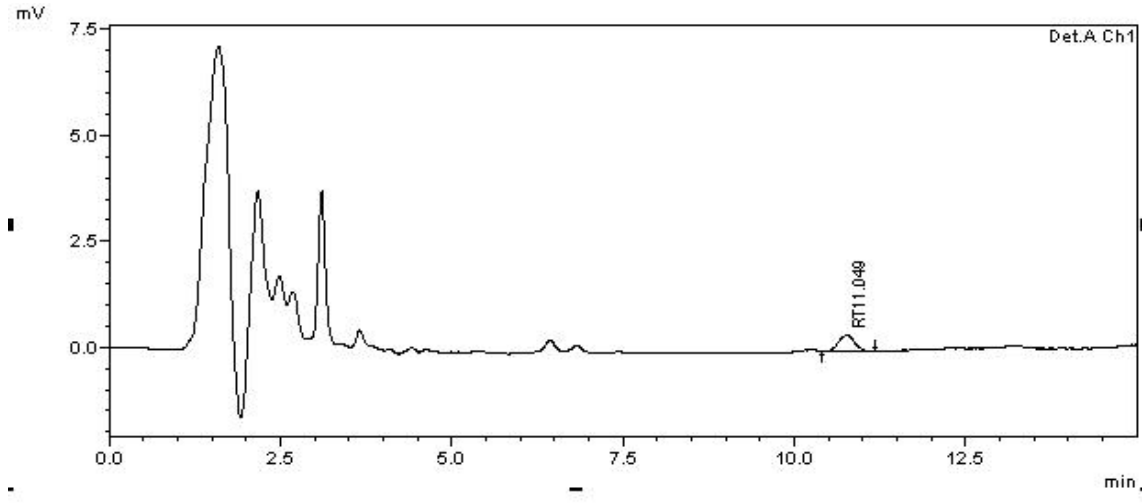
Şekil 4-4: a) OTA standartına (5µg/kg) ve b) OTA-metil esterine ait kromatogramlar.

4.2. Örneklere ait Analiz Sonuçları ve OTA'nın Maruziyet Değerlendirmesi

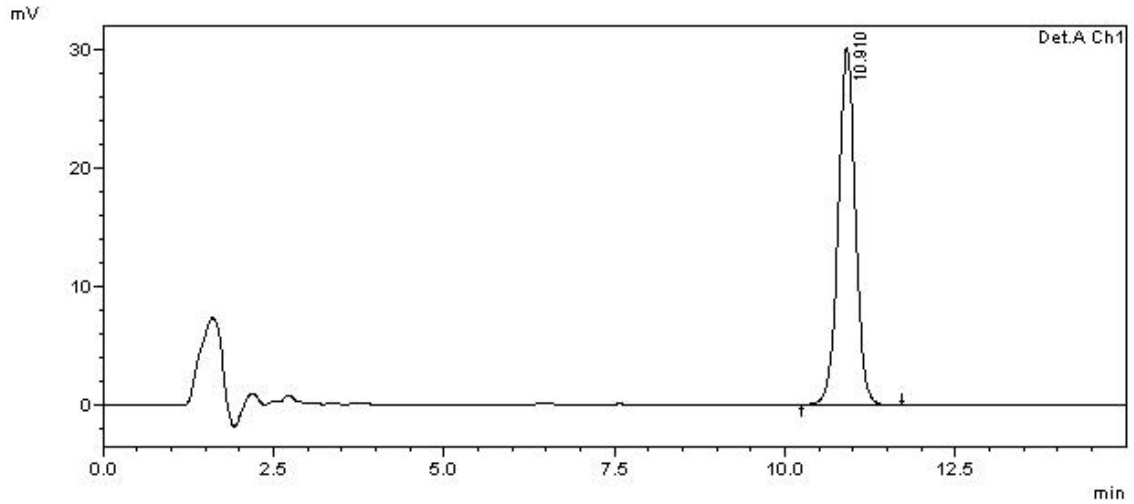
Şekil 4-5'de OTA tespit edilmemiş kapalı olarak satılan kırmızı pul biber örneği, Şekil 4-6'da0,38 µg/kg konsantrasyonda OTA tespit edilmiş kapalı olarak satılan kırmızı pul biber örneği ve Şekil 4-7'de31,73 µg/kg konsantrasyonda OTA tespit edilmiş açıkta satılan kırmızı pul biber örneğine ait kromatogramlar gösterilmiştir.



Şekil 4-5: OTA tespit edilmemiş kapalı olarak satılan kırmızı pul biber örneğine ait kromatogram.



Şekil 4-6: 0,38µg/kg konsantrasyonda OTA tespit edilmiş kapalı olarak satılan kırmızı pul biber örneğine ait kromatogram.



Şekil 4-7: 31,73µg/kgkonsantrasyonda OTA tespit edilmiş açıkta satılan kırmızı pul biber örneğine ait kromatogram

Bölüm 3.8'de anlatıldığı şekilde analizleri yapılan kırmızı pul biber örneklerindeki OTA düzeylerine ait sonuçlar Tablo 4-6'da verilmiştir.Kapalı olarak satılan kırmızı pul biber örneklerinin (31 adet) 27 tanesinde (% 87,10) 0,055-0,982μg/kg konsantrasyonlarda OTA'ya rastlanırken, açıkta satılan kırmızı pul biber örneklerinin hepsinde (44 adet, % 100) 1,118-31,736μg/kg oranlarda OTA'ya rastlanmıştır (Tablo 4-7). Açıkta satılan kırmızı pul biber örneklerinin 2 tanesinde 15 ppb ve 2 tanesinde ise 30 ppb üzerinde OTA'ya rastlanmıştır. Bu değerlerin, 29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan 'Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği''ne göre 1 Temmuz 2012 tarihinden sonra geçerli olacak olan kırmızı pul biberlerde maksimum OTA seviyelerinin (15 μg/kg) üzerinde olduğu görülmüştür (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011).

Maksimum OTA tespit edilen değer (31,736μg/kg) dikkate alınarak OTA'nın kırmızı pul biberlerde maruziyet miktarı hesaplandı. Ozcan ve Akbay tarafından Turkiye'de kişi başına yıllık ortalama kırmızı biber tuketimi 2005 yılında 220 g civarında olduğu bildirilmiştir (Özcan ve Akbay, 2013). Dolayısıyla, günlük kırmızı pul biber tüketim miktarı 0,6 g, maksimum OTA tespit edilen değer 31,736 μg/kg ve ortalama vücut ağırlığı da 70 kg olarak belirlenirse; tahmin edilebilir günlük OTA maruziyeti 0,27 ng/kg/vücut ağırlığı ve haftalık OTA maruziyeti ise; 1,9 ng/kg/vücut ağırlığı olarak hesaplanabilir. Bu değerin JECFA tarafından belirlenen PTWI değeri 100 ng/kg vücut ağırlığı'ndan daha düşük olduğu gözlenmektedir (JECFA, 2007).

Tablo 4-6: Tez çalışmasında analiz edilen kırmızı pul biber örneklerindeki OTA düzeyleri

Açıkta satılan pul biber örnekleri				Kapalı ambalajda satılan pul biber örnekleri			
Örnek No.	**OTA Düzeyi (ppb)**	**Örnek No.**	**OTA Düzeyi (ppb)**	**Örnek No.**	**OTA Düzeyi (ppb)**	**Örnek No.**	**OTA Düzeyi (ppb)**
2	2,8304	**35**	3,5590	**1**	0,5971	**53**	**t.e**
4	10,5632	**36**	1,8368	**3**	0,6547	**54**	0,3113
5	6,0151	**37**	2,5077	**10**	0,5752	**55**	0,2896
6	**15,3093**	**38**	5,9824	**12**	0,1542	**58**	**t.e**
7	3,4352	**41**	5,3862	**14**	0,9824	**59**	0,3828
8	1,9384	**42**	1,7262	**15**	0,6332	**68**	0,0573
9	**31,7360**	**44**	3,8496	**19**	0,3265	**70**	0,1433
11	5,7230	**48**	3,0746	**22**	0,1147	**72**	0,9582
13	2,0544	**56**	1,2355	**24**	0,4047	**73**	0,6995
16	3,0173	**57**	2,6030	**25**	0,6944		
17	1,7855	**60**	2,6923	**28**	**t.e**		
18	5,1486	**61**	1,1342	**31**	0,1590		
20	4,7556	**62**	10,2998	**39**	0,0659		
21	1,2091	**63**	5,9703	**40**	0,7804		
23	1,1179	**64**	**15,0124**	**43**	0,9069		
26	4,6786	**65**	3,5700	**45**	0,1181		
27	4,9567	**66**	1,9905	**46**	0,5184		
29	1,4209	**67**	**31,3333**	**47**	0,0546		
30	4,7093	**69**	5,7490	**49**	0,2191		
32	1,9011	**71**	2,1605	**50**	**t.e**		
33	1,1589	**74**	3,0693	**51**	0,4717		
34	1,3055	**75**	2,0136	**52**	0,2304		

t.e:tespit edilemedi

Tablo 4-7: Tez çalışmasında analiz edilen kırmızı pul biber örneklerinde OTA varlığı

	Örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı (%)	Konsantrasyon aralığı (µg/kg)	< LOD	0,05-1 µg/kg (%)	1-5 µg/kg (%)	5-15 µg/kg (%)	15-30µg/kg (%)	> 30µg/kg (%)	Ortalama ± SD
Açıkta satılan pul biber örnekleri	44	44 (100)	1,118-31,736	-	-	31 (70,45)	9 (20,45)	2 (4,55)	2 (4,55)	5,31 ± 6,6
Kapalı ambalajda satılan pul biber örnekleri	31	27 (87,10)	0,055-0,9824	4 (12,90)	27 (87,10)					0,43 ± 0,3
Toplam	75	71 (94,67)	0,055-31,736	4 (5,33)	27 (36)	31 (41,33)	9 (12)	2 (2,67)	2 (2,67)	3,45 ± 5,7

5. TARTIŞMA

Okratoksinler, aflatoksinlerin dışında doğada en yaygın bulunan mikotoksin grubudur. Okratoksinler, ilk kez 1965 yılında sorgum tanelerinden izole edilen *Aspergillus ochraceus* kültüründen izole edilmiştir (van der Merwe ve ark., 1965). Daha sonraki araştırmalarda dünya üzerinde ılıman iklimin hakim olduğu yerlerde yaygın bulunan bir depo küfü olan *Penicillium verrucosum'*un da okratoksinleri salgıladığı belirlenmiştir (Ciegler ve ark., 1972; van Walbeek ve ark., 1969). Okratoksinler içerisinde toksikolojik öneme sahip olan tek mikotoksin, OTA'dır. Peptid bağı ile fenilalanin bağlanmış bir isokumarin türevi olan OTA'nın oluşumunu belirleyen en önemli iki faktör sıcaklık ve nemdir. OTA memelilerde akut ve kronik lezyonlara sebep olan önemli bir nefrotoksindir. IARC tarafından insanda muhtemel karsinojen (2B grubu) olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 1993). Aynı zamanda OTA, başta Balkan ülkelerinin (Bosna, Bulgaristan, Hırvatistan, Romanya ve Sırbistan) kırsal bölge insanlarında görülen "Balkan Endemik Nefropatisi" (BEN) olmak üzere, Mısır ve Tunus'da görülen ve etiyolojisi bilinmeyen nefropatiler ve böbrek tümörlerinden de sorumlu tutulmaktadır (Mally ve ark., 2007). Elde edilen epidemiyolojik bilgiler, BEN'nin OTA içeren yiyecek tüketimiyle bağlantılı olduğu sonucunu desteklemektedir. JEFCA, OTA'nın nefrotoksik etkisini göz önüne alarak PTWI değerini 100ng/kg vücut ağırlığı (14 ng/kg vücut ağırlığı/gün'e eşit) olarak bildirilmiştir (JECFA, 2007).

OTA yaygın olarak tahıl ve tahıl ürünlerinde bulunmaktadır. Avrupa Birliği Komisyonu tarafından yapılan maruziyet değerlendirmesinde; Avrupa ülkelerinin toplam diyetinin %50'sini kapsayan tahıl ve tahıl ürünlerinin temel olarak OTA maruziyet kaynağı olduğu bildirilmiştir. (Avrupa Birliği Komisyonu, SCOOP, Task 3.2.7, 2002). Tahıl ve tahıl ürünleri dışında, OTA'nın kakao, kuru meyve, yer fıstığı, kahve, baharat, yağ, süt ve süt ürünleri, çay, bira, sirke, üzüm suyu, bebek maması ve şarap gibi çeşitli gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir. Tarımsal ürünlerde OTA oluşumu uygun koşullar bulunduğu takdirde hasattan tüketime kadar hemen her aşamada meydana gelebilmektedir.

İnsan ve hayvan sağlığı açısından büyük risk oluşturduğu kanıtlanan OTA'nın gıdalar ve yemlerdeki düzeyinin gerçekçi olarak belirlenmesi amacıyla yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Tüketicilere en düşük değerde toksin içeren ürünlerin

ulaştırılmasını sağlamak, ayrıca OTA'lı ürünler sebebiyle ortaya çıkabilecek ekonomik kayıpları en aza indirgemek amacıyla birçok ülkede yasal limitler yeniden düzenlemekte, gıda maddelerindeki dağılımları ortaya koyacak tarama ve izleme programları düzenlemektedir. Türkiye'de 29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan 'Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği' yürürlükte oluıp, bu yönetmelikte baharatlar için maksimum OTA limiti 15 μg/kg olarak belirlenmiştir (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011).

Bugün OTA, gıda maddelerinde ve hayvan yemlerde bulunabilen en tehlikeli bulaşıcılardan biri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, gıdaların ve yemlerin OTA yönünden kontrolü büyük önem taşımaktadır. Ancak ülkemizde henüz OTA'ya maruziyetin derecesinin ortaya çıkmasına yetecek sayıda araştırma yapılmamıştır.

Tez çalışmasında İstanbul'un çeşitli semtlerindeki pazar ve marketlerden toplanan toplam 75 adet kırmızı pul biber örneğinin analizi yapıldı. Örnekler, kapalı markalı ambalajlarda ve baharatçılarda açıkta markasız satılan kırmızı pul biberleri şeklinde gruplandırılarak, OTA'nın bu ürün gubunda risk değerlendirilmesi gerçekleştirildi. Örneklerin analizinde Avrupa Birliği Komisyonu Direktifinde (Avrupa Birliği Komisyonu, SCOOP, Task 3.2.7, 2002) yer alan organik çözücüler ile ekstraksiyon ve immünoafinite kolon ile temizlemenin ardından valide edilmiş fluoresans dedektör donanımlı ters faz HPLC yöntemi kullanıldı.

Gıdalarda ve biyolojik ürünlerde OTA analizinde, OTA'nın örneklerden uygun çözücü (su ve asetonitril ya da metanol karışımları) ile ekstraksiyonunun ardından, OTA'ya özgü antikorlar içeren immünoafinite kolonlar ile saflaştırılması en yaygın olarak kullanılan ektraksiyon ve temizleme yöntemidir. OTA'nın HPLC ile analizinde ise; OTA doğal fluoresans gösteren bir madde olduğundan dolayı herhangi bir türevlendirme işlemine gerek olmadan çok düşük seviyelerde ve yüksek hassasiyette OTA'yı fluoresans dedektörle tayin etmek mümkün olabilmektedir. Tez çalışmasında OTA'nın kırmızı pul biberlerde analizi OchraTest WB^{TM} (Vicam) test protokolüne uygun olarak fluoresans dedektör donanımlı HPLC cihazında gerçekleştirildi.

Analiz yöntemi için yapılan validasyon çalışmasında seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, LOD, LOQ ve kararlılık parametreleri araştırıldı. Yöntemin kırmızı pul biber örneklerinde 0,05-40 μg/kg konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu gösterildi (r^2=0,0997). Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışmalarında

ise RSD (%) değerlerinin <9,1'den küçük olduğu gösterildi. Doğruluk çalışmalarında ise, 0,05-40 μg/kg konsantrasyon aralığında geri kazanım oranları %83,32-93,13 olarak bulundu. Kırmızı pul biber örneklerinde OTA'nın LOD değeri 0,015 iken, LOQ değeri ise 0,05 olarak ölçüldü. Bu sonuçlara göre analiz yönteminin Türk Gıda Kodeksi, "Gıda Maddelerinde Mikotoksinlerin Seviyesinin Resmi Kontrolü için Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri" Tebliginde (Tebliğ No: 2011/32) (28026 sayılı Resmi Gazete, 2011) ve Avrupa Birliği Komisyonu Direktifinde (EC, 401/2006) (Avrupa Birliği Komisyonu, 2006b)yer alan OTA için analiz metodu performanstesti ile ilgili parametrelere uygun olduğugörülmüştür.

Çalışılan 31 adet kapalı ambalajda satılan kırmızı pul biber örneklerinin %87,10'unda 0.055-0.982 μg/kg konsantrasyon aralığında OTA'ya rastlanmıştır. Çalışılan 44 adet açıkta satılan markasız kırmızı pul biber örneklerinin ise %100'ünde 1,118-31,736 μg/kg konsantrasyon aralığında OTA'ya rastlanmış olup, bu örneklerin 4'ünde ise Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Komisyonu tarafından belirlenen maksimum OTA limitinin (15 μg/kg) üzerinde 15,012-31,736 μg/kg konsantrasyonlarda OTA bulunmuştur.

Türkiye'de baharatlarda OTA varlığı konusunda yapılmış sadece 1 adet çalışma bulunmaktadır. Özbey ve Kabak (2012) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada 24 kırmızı pul biber örneğinin 18'inde (%75) 0,46-53,04 μg/kg konsantrasyonlarda ve 4'ünde (%16,7) ise Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Komisyonu tarafından belirlenen maksimum OTA limitinin üzerinde OTA'ya rastlanmıştır. Ayrıca, kırmızı toz biberlerde ise 22 örneğin 12 (%54,5) tanesinde 0,78-98,2 μg/kg konsantrasyonlarda ve bunların 3'ünde (%13,6) ise Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Komisyonu tarafından belirlenen maksimum OTAlimitinin üzerinde OTA'ya rastlanmıştır (Ozbey ve Kabak, 2012). Ozbey ve Kabak (2012) tarafından elde edilen bu sonuçlarda kırmızı pul biberlerde daha yüksek oranda OTA tespit edilmesine rağmen, sonuçların tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile benzer olduğu gözlenmektedir.

Thirumala-Devi ve ark. (2000) Hindistan'da yapılan bir çalışmada analiz edilen 100 adet kurutulmuş acı kırmızı biber örneğinin 26'sında (%26) 10–120 μg/kg oranında OTA'ya rastlamıştır. Macaristan'da gerçekleştirilen bir çalışmada 70 adet öğütülmüş kırmızı biber örneğinin 32'sinde (%45,7) 0,4-66,2 μg/kg oranında OTA bulunmuş olup, 5 adet acı kırmızı biber örneğinin ise 1'inde 2,1 μg/kg konsantrasyonda OTA'ya

rastlanmıştır (Fazekas ve ark., 2005). Brezilya'da gerçekleştirilen bir çalışmada 70 adet toz kırmızı biber örneğinin 60'ında (%85,7) 0,24-97,2 μg/kg oranında OTA bulunmuştur (Shundo ve ark., 2009). Santos ve arkadaşlarının (2010) İspanya'da yaptıkları bir çalışmada; 64 adet kırmızı biber örneğinin %98'inde (<LOQ-281 μg/kg) ve 35 adet acı kırmızı biber örneğinin ise %100'ünde (0,62-44,6 μg/kg) OTA bulunmuştur. Jalili ve Jinap (2012) tarafından Malezya'da yapılan çalışmada; 80 adet acı kırmızı biber örneğinin 65'inde (%81,25) 0,2-101,24 μg/kg oranında OTA tespit edilmiştir. İtalya'da acı kırmızı biberlerde 30 örneğin 12'sinde (%40) 6,72-10,18 μg/kg oranında OTA bulunduğu rapor edilmiştir (Prelle ve ark., 2013). Skorkova ve ark. (2013) ise, Çek Cumhuriyeti'nde 12 adet acı kırmızı toz biberin %100'ünde 0,1-91,8 μg/kg, 12 adet tatlı kırmızı biberin %100'ünde 0,1-38,4 μg/kg ve 11 adet acı kırmızı biberin de %98'inde 0,1-32,7 μg/kg OTA verlığı tespit etmişlerdir.

Çalışmamızın sonucunda, açıkta satılan kırmızı pul biberlerinin OTA içeriği yönünden risk oluşturduğu düşünülmektedir. Ayrıca, diğer bir önemli nokta ise; bu değerlerin birçok ülkede beslenme alışkanlıklarına göre ve her ürün için günlük tüketilen miktarlar esas alınarak günlük maruziyet miktarlarının hesaplanmasıdır. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlardan hareketle, maksimum OTA tespit edilen değer (31,736μg/kg) dikkate alınarak OTA'nın kırmızı pul biberlerde maruziyet miktarı hesaplanmıştır. Turkiye'de kişi başına yıllık ortalama kırmızı biber tuketimi 2005 yılında 220 g civarında olduğu bildirilmiştir (Özcan ve Akbay, 2013). Dolayısıyla, günlük kırmızı pul biber tüketim miktarı 0,6 g, maksimumOTA tespit edilen değer 31,736 μg/kgve ortalama vücut ağırlığı da 70 kg olarak belirlenirse; tahmin edilebilir günlük OTA maruziyeti 0,27 ng/kg/vücut ağırlığı ve haftalık OTA maruziyeti ise; 1,9 ng/kg/vücut ağırlığı olarak hesaplanabilir. Bu değerin JECFA tarafından belirlenen PTWI değeri 100 ng/kg vücut ağırlığı'ndan (günlük 14 ng/kg vücut ağırlığına eşit) daha düşük olduğu gözlenmektedir (JECFA, 2007).OTA'nın kırmızı pul biberler ile maruziyeti günlük alınabilen maksimum limitlerin altında bulunmuş olsa bile kırmızı pul biberlerde yüksek seviyelerde bulunduğundan dolayı dikkatle değerlendirilmesi gerekmektedir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile gıda örneklerinin iyi koşullarda ve uygun ambalajlarda saklanmasının OTA oluşumunda ne kadar etkili olduğu gösterilmektedir. Özellikle de baharatçılarda ambalajsız olarak açıkta satılan örneklerin

yüksek oranda OTA oluşturma ve içerme konusunda riskli olduğu da açık olarak görülmektedir. Açıkta satılan kırmızı pul biberlerinde OTA'nın yüksek seviyelerde bulunması, kırmızı pul bibelerinin hazırlanması ve saklanması sırasında uygulanan yöntemlerin küf mantarlarını aktif hale getirip OTA üretebilmelerine imkan sağlamasının sonucu olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak; beslenme açısından değerli olan pek çok ürün aynı zamanda OTA açısından da risk taşımaktadır. Toplumun her kesimini tehdit eden bu riskin azaltılması için gıdalarda gerekli kontrollerin düzenli olarak yapılması; tüketicilere OTA'lı gıdaların ulaşmasının engellenmesi; üreticilerin OTA hakkında bilgilendirilmesi ve OTA oluşumunun engellenmesi için gerekli önlemlerin alınması konularında ilgili kurumların işbirliği içerisinde ortak çözümler aramaları gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abid, S., Hassen, W., Achour, A., Skhiri, H., Maaroufi, K., Ellouz, F., Creppy, E., Bacha, H. (2003). Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic?. *Human and Experimental Toxicology*, ***22***(2), 77-84.

Akdeniz, A. S., Ozden, S., Alpertunga, B. (2013). Ochratoxin A in dried grapes and grape-derived products in Turkey. *Food Additives and Contaminants: Part B*, ***6***(4), 265-269.

Alpsoy, L., Kiren, A., Can, S. N., Köprübaşı, A. (2013). Assessment of total aflatoxin level in red pepper obtained from Istanbul. *Toxicology and Industrial Health*, ***29***(9), 867-871.

Ardic, M., Karakaya, Y., Atasever, M., Durmaz, H. (2008). Determination of aflatoxin B 1 levels in deep-red ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with ELISA. *Food and Chemical Toxicology*, ***46***(5), 1596-1599.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commision). (1997). SCOOP. Task 3.2.2. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States, Reports on Tasks for Scientific Cooperation.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commision). (2002). SCOOP, Task 3.2.7, Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population oof EU Member States, Reports on Tasks for Scientific Cooperation.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commision). 2002. Commission Regulation (EC)No 472/2002of 12 March 2002amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities, L75/18.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commision). (2004). Commission Regulation (EC) No 683/2004of 13 April 2004amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards aflatoxins and ochratoxin A in foods for infantsand young children. Official Journal of the European Union, L106/3.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commision). (2006a). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum. levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L364, 5.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commision). (2006b). Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels ofmycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L70/12.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commision).(2010). Commission Regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximumlevels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. Official Journal of the European Union, L35, 7.

Aydin, A., Erkan, M. E., Başkaya, R., Çiftçioğlu, G. (2007). Determination of aflatoxin B 1 levels in powdered red pepper. *Food Control*, ***18***(9), 1015-1018.

Bata, Á., Lásztity, R. (1999). Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*, ***10***(6), 223-228.

Berry, C. L. (1988). The pathology of mycotoxins. *The Journal of Pathology*, ***154***(4), 301-311.

Bircan, C., Barringer, S. A., Ulken, U., Pehlivan, R. (2008). Aflatoxin levels in dried figs, nuts and paprika for export from Turkey. *International Journal of Food Science & Technology*, ***43***(8), 1492-1498.

Bruinink, A., Rasonyi, T. Sidler, C. (1998). Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin-alpha in vitro. *Natural Toxins*, **6**, 173–177.

Center for Food Safety. (2006). Ochratoxin A in Food. Risk Assesment Studies. Report No: 23.

Chu, F. S., Li, G. Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, ***60***(3), 847-852.

Coronel, M. B., Sanchís Almenar, V., Marín Sillué, S., L'ocratoxina, A. (2011). Risk analysis of ochratoxin A in the frame of food safety: Exposure assessment (Doktora Tezi).

Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, ***127***(1), 19-28.

Creppy, E. E., Röschenthaler, R., Dirheimer, G. (1984). Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food and Chemical Toxicology*, ***22***(11), 883-886.

Çoksöyler, N. (1999). Farklı Yöntemlerle Kurutulan Kırmızıbiberlerde Aspergillus flavus Gelişimi ve Aflatoksin Oluşumunun İncelenmesi. *Gıda Dergisi*, ***24***(5), 297-306.

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

Demircioğlu, S., Filazi, A. (2010). Türkiye'de Üretilen Kırmızı biberlerde Aflatoksin Kalıntılarının Araştırılması. *Veteriner Hekim Derneği Dergisi,* ***81***(2), *63-66.*

Dokuzlu, C. (2001). Kırmızı toz biberlerde aflatoksin. *Journal of The Faculty of Veterinary Medicine*, ***20***, 19-23.

EFSA Report.(2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. The *EFSA Journal*, ***365***, 1-56.

El-Kady, I. A., El-Maraghy, S. S. M., Mostafa, M. E. (1995). Natural occurrence of mycotoxins in different spices in Egypt. *Folia Microbiologica*,***40***(3), 297-300.

Erdoğan, A. (2004). The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. *Chemosphere*, ***56***(4), 321-325.

European Mycotoxin Awareness Network. Fact Sheet 3. Ochratoxin A. Available from: URL: http://193.132.193.215/eman2/fsheet3.asp. Erişim: 01.05.2014.

Fazekas, B., Tar, A., Kovacs, M. (2005). Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives and Contaminants*, ***22***(9), 856-863.

Fink-Grernmels, J. (1999). Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly*, ***21***(4), 115-120.

Frenette, C., Paugh, R. J., Tozlovanu, M., Juzio, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R. A. (2008). Structure–activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites. *Analytica Chimica Acta*, ***617***(1), 153-161.

Goryacheva, I. Y., De Saeger, S., Lobeau, M., Eremin, S. A., Barna-Vetró, I., Van Peteghem, C. (2006). Approach for ochratoxin A fast screening in spices using clean-up tandem immunoassay columns with confirmation by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS). *Analytica Chimica Acta*, ***577***(1), 38-45.

Halász, A., Lásztity, R., Abonyi, T., Bata, Á. (2009). Decontamination of mycotoxin-containing food and feed by biodegradation. *Food Reviews International*, ***25***(4), 284-298.

Hall, P. W., Dammin, G. J., Griggs, R. C., Fajgelj, A., Zimonjic, B., Gaon, J. (1965). Investigation of chronic endemic nephropathy in Yugoslavia: II. Renal pathology. *The American Journal of Medicine*, ***39***(2), 210-217.

Harrison, L. R., Colvin, B. M., Greene, J. T., Newman, L. E., Cole, J. R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of Fusarium moniliforme. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, ***2***(3), 217-221.

Hassen, W., Abid-Essafi, S., Achour, A., Guezzah, N., Zakhama, A., Ellouz, F., Creppy, E.E., Bacha, H. (2004). Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: respective role of Ochratoxin A and possible genetic predisposition. *Human and Experimental Toxicology*, ***23***(7), 339-346.

Hernández Hierro, J. M., Garcia-Villanova, R. J., Rodríguez Torrero, P., Toruno Fonseca, I. M. (2008). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***56***(3), 751-756.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1993. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Cas No: 303-47-9, vol 56.

Jalili, M., Jinap, S. (2012). Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili. *Food Control*, ***24***(1), 160-164.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting & World Health Organization.. (2007). *Evaluation of certain food additives and contaminants* (Vol. 68).

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, & World Health Organization. (2001). *Safety evaluation of certain mycotoxins in food* (Vol. 74).

Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Basinskiene, L., Matusevicius, P. (2012). *Mycotoxin decontamination aspects in food, feed and renewables using fermentation processes*. Intech Open Access Publisher.

Kanbur, M., Liman, B. C., Eraslan, G., Altınordulu, Ş. (2006). Kayseri'de Tüketime Sunulan Kırmızı Biberlerde Aflatoksin B1'in Enzim İmmunoassay (EIA) ile Kantitatif Analizi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, ***3***(1), 21-24.

Karaaslan, M., Arslanğray, Y. (2015). Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 contamination in ground red peppers commercialized in Sanliurfa, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, ***187***(4), 1-9.

Karagöz, S. (2001). Growth and aflatoxin production ofaspergillus flavus on some spices marketed in Turkey. *Mycotoxin Research*, ***17***(1), 2-8.

Kellerman, T. S., Marasas, W. F., Thiel, P. G., Gelderblom, W. C., Cawood, M., Coetzer, J. A. (1990). Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, ***57***(4), 269-275.

Kotsonis, F.N., Burdock, G.A. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Sciences of Poisons 8th ed.31th Chapter Food Toxicology*. (Editor Klassen, C.D.), New York, McGraw-Hill, p.1338.

Li, S., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., Vitti, T. G., Crow, G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, ***145***(1), 82-90.

Malir, F., Ostry, V., Novotna, E. (2013). Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, ***32***(2), 19-33.

Mally, A., Hard, G. C., Dekant, W. (2007). Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: lessons from toxicity studies in rats. *Food and Chemical Toxicology*, ***45***(11), 2254-2260.

Marasas, W. F., Kellerman, T. S., Gelderblom, W. C., Coetzer, J. A., Thiel, P. G., Van der Lugt, J. J. (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from Fusarium moniliforme. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, ***55***(4), 197-203.

Meşeci, N., Alpertunga B. (2001).Ochratoxin A Analysis In Corn And Corn Samples by TLCand HPLC. *Toxicology Letters*, ***123***(Supplement 1), 43.

O'Callaghan, J., Caddick, M. X., Dobson, A. D. W. (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in Aspergillus ochraceus. *Microbiology*, ***149***(12), 3485-3491.

Omaye, S.T. 2004. Food and Nutritional Toxicology. Boca Raton London, New York, Washington, D.C. CRC Press LLC, Chapter 13.

Omurtag, G.Z. (2002). Mikotoksinli besinlerin oluşturacağı tehlikeler. *Clinic,*1, 34-37.

Ozden, S., Akdeniz, A. S., & Alpertunga, B. (2012). Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey. *Food Control*, ***25***(1), 69-74.

Özbey, F., Kabak, B. (2012). Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control*, ***28***(2), 354-361.

Özcan, D., Akbay, C. (2013). Kahramanmaraş İli Merkez İlçede Yaşayan Tüketicilerin Kırmızıbiber Tüketim Alışkanlıkları. *Kahramanmaras Sutcu Imam University Journal of Natural Sciences*, ***16***(1), 33-41.

Özkan, A., Bindak, R., & Erkmen, O. (2015). Aflatoxin B1 and aflatoxins in ground red chilli pepper after drying. *Food Additives & Contaminants: Part B*, ***10***, 1-7.

Park, D. L., Ayala, C. E., Guzman-Perez, S. E., Lopez-Garcia, R., Trujillo, S. (2000). *Microbial toxins in foods: algal, fungal, and bacterial,* Boca Raton, FL. CRC Press, pp. 93-136.

Patel, S., Hazel, C. M., Winterton, A. G. M., Mortby, E. (1996). Survey of ethnic foods for mycotoxins. Food Additives and Contaminants, ***13***(7), 833-841.

Patharajan, S., Reddy, K. R. N., Karthikeyan, V., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2011). Potential of yeast antagonists on invitro biodegradation of ochratoxin A. *Food Control*, ***22***(2), 290-296.

Pereira, P., Nesci, A., Castillo, C., Etcheverry, M. (2010). Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B 1 content and Fusarium verticillioides infection of field-grown maize. *Biological Control*, ***53***(3), 258-266.

Prelle, A., Spadaro, D., Denca, A., Garibaldi, A., Gullino, M. L. (2013). Comparison of clean-up methods for ochratoxin A on wine, beer, roasted coffee and chili commercialized in Italy. *Toxins*, ***5***(10), 1827-1844.

Puntarić, D., Bošnir, J., Šmit, Z., Škes, I., Baklaić, Ž. (2001). Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropathy. *Croatian Medical Journal*, ***42***, 175-180.

Reddy, K. R. N., Reddy, C. S., Muralidharan, K. (2009). Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by Aspergillusflavus infecting rice grains. *Food Control*, ***20***(2), 173-178.

Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *International Journal of Food Microbiology*, ***119***(1), 3-10.

Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, ***159***(1), 18-46.

Sabuncuoğlu Atasayar, S., Baydar, T., Giray, B., Şahin, G. (2008). Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, ***28***(1), 63-92.

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

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

Scientific Committee on Food (SCF) 1998. Opinion on ochratoxin A. Expressed on 17 September 1998, the Scientific Committee on Food, the European Commission. Erişim : [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out14_en.html]. Erişim: 07.05.2014.

Semple, R.L., Firo, A. S., Hicks, P. A., Lozare, J. V. (1989). *Mycotoxin Prevention and Control in Food-grains*. UNDP/FAO.

Set, E., Erkmen, O. (2010). The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, ***48***(8), 2532-2537.

Shundo, L., de Almeida, A. P., Alaburda, J., Lamardo, L. C., Navas, S. A., Ruvieri, V., Sabino, M. (2009). Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. *Food Control*, ***20***(12), 1099-1102.

Skarkova, J., Ostry, V., Malir, F., Roubal, T. (2013). Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, ***46***(10), 1495-1504.

Styriak, I., Concova, E. (2002). Microbial binding and biodegradation of mycotoxins. *Veterinary and Human Toxicology*, Vol. 44, pp. 358-361.

Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Marasas, W. F., Shephard, G. S., Van Schalkwyk, D. J., Koch, K. R. (1990). Natural occurrence of some Fusarium mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***38***(10), 1900-1903.

Şen, L., Nas, S. (2010). Kuru İncir, Üzüm ve Kırmızı biberlerde Mikotoksin Varlığı, *Akademik Gıda*, ***8***(3), 24-32.

T.C. Resmi Gazete, 16 Kasım 1997. Sayı: 23172. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Mikrobiyal Toksinler. s.124.

T.C. Resmi Gazete, 23 Eylül 2002. Sayı: 24885. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ. Tebliğ No: 2002/63.

T.C. Resmi Gazete, 17 Mayıs 2008. Sayı: 26879. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ. Tebliğ No: 2008/26.

T.C. Resmi Gazete, 15 Ağustos 2011. Sayı: 28026. Türk Gıda Kodeksi Gıdalardaki Mikotoksin Limitlerinin Resmi Kontrolü için Numune Alma, Numune Hazirlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliğ. Tebliğ No: 2011/32.

T.C. Resmi Gazete, 29 Aralık 2011. Sayı: 28157. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği.Yetki Kanunu No : 5996.

T.C. Resmi Gazete, 10 Nisan 2013. Sayı: 28614. Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği. Tebliğ No: 2013/12.

Taydaş, E.E., Aşkın, O. (1995). Kırmızı biberlerde aflatoksin oluşumu, *Gıda*, ***20***(1), 3–8.

Thiel, P. G., Marasas, W. F., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., Gelderblom, W. C., Nieuwenhuis, J. J. (1991). Survey of fumonisin production by Fusarium species. *Applied and Environmental Microbiology*, ***57***(4), 1089-1093.

Thirumala-Devi, K., Mayo, M. A., Reddy, G., Reddy, S. V., Delfosse, P., Reddy, D. V. R. (2000). Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***48***(10), 5079-5082.

Tunail, N. (2000). Funguslar ve Mikotoksinler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Universitesi Ziraat Fakültesi Gıda Muhendisliği Bölümü yayını, s:522, 03.Bolum, 13.kısım, Sim Matbaası, Ankara.

Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh. *Nature, Nature* 205, 1112 – 1113.

Wafa, E. W., Yahya, R. S., Sobh, M. A., Eraky, I., El-Baz, M., El-Gayar, H. A., Betbeder, A.M., Creppy, E. E. (1998). Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Human and Experimental Toxicology*, ***17***(2), 124-129.

World Health Organization. (1990). Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot.*Environmental Health Criteria* 105.

Yentür, G., Er, B. (2011). Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. Proje No: 02/2009-16.

Yıldırım, T. (1996). Bursa ve Sakarya yöreleri kırmızı biberlerinde aflatoksin çalışması. *Gebze yüksek Teknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*.

Yoshizawa, T., Yamashita, A., Luo, Y. (1994). Fumonisin occurrence in corn from high-and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology*, ***60***(5), 1626-1629.

Zimmerli, B., Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, ***666***(1), 85-99.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Alperen	**Soyadı**	Tosun
Doğ.Yeri	Trabzon	**Doğ.Tar.**	01.01.1987
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	50944779500
Email	alperen.tosun1@gmail.com	**Tel**	0507 605 61 69

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi	2010
Lise	Trabzon Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Memur	Cumhurbaşkanlığı Koruma Dairesi	2012-2015
2.	Memur	Başbakanlık Koruma Dairesi	2012
3.	Stajyer	Viyana Teknoloji Üniversitesi	2010
4.	Dalgıç	Hyatt Regency Chesapeake Bay Marina	2009
5.	Stajyer	Adli Tıp Kurumu Trabzon	2008

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	İyi	Orta	68	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	80.623	76.190	60.895

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri:

TS EN ISO/EC 17025 Deney Laboratuarlarının Akreditasyonu

Alperen Tosun, Sibel Özden. Occurrence of Ochratoxin A in red pepper powder commercialized in Turkey. 54th SOT Annual Meeting and ToxExpo. 22-26 Mart 2015. San Diego. Amerika Birleşik Devletleri.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Dalış