T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KURU ÜZÜM VE ÜRÜNLERİNDE OKRATOKSİN A VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

AYŞE SİBEL ÜNAL

DANIŞMAN
PROF. DR. BUKET ALPERTUNGA

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yülsek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

17 /03 /2009

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Farmasötik Toksikoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Farmasötik Toksikoloji
Tez Sahibi : Ayşe Sibel Ünal
Tez Başlığı : Kuru Üzüm ve Ürünlerinde Okratoksin A Varlığının Araştırılması
Sınav Yeri : İ.Ü. Eczacılık Fakültesi
Sınav Tarihi : 27 / 02 / 2009

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1.Prof. Dr. Buket Alpertunga (İ.Ü. Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Toksikoloji A.B.D.)
(Tez Danışmanı)

2.Doç. Dr. Münevver Açıkkol (İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü)

3.Doç. Dr. Sevgi Tatar Ulu / İ. Ü. Eczacılık Fakültesi / Analitik Kimya ABD

4.Yrd. Doç. Dr. Olcay Sağırlı/ İ. Ü. Eczacılık Fakültesi / Analitik Kimya ABD

5.Yrd. Doç. Dr. Gül Özhan / İ. Ü. Eczacılık Fakültesi / Farmasötik Toksikoloji ABD

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.

Ayşe Sibel Ünal



İTHAF

Sevgili Ablama ithaf ediyorum…

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım çok değerli danışman hocam Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya ;

Deneysel çalışmalarım esnasında bana her konuda destek olan Yard. Doç. Dr. Gül Özhan ve Araş. Gör. Dr. Sibel Özden'e;

Ve eğitim hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayan, attığım her adımda yanımda olduklarını hissettiğim, başta Annem ve Ablam olmak üzere sevgili Aileme;

Teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek Lisans tez çalışmam sırasında TÜBİTAK Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiş olduğumdan dolayı TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
BEYAN..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR..... V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... Xİİ
ABSTRACT..... Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ..... 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Mikotoksinler 4
2.1.1. Mikotoksikozis 6
2.1.2. Mikotoksikozise Neden Olan Küfler 7
2.1.3. Mikotoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri 8
2.1.4. Mikotoksin Üretimini Etkileyen Faktörler 9
2.1.5. Türkiye'de Mikotoksin Sorunu 11
2.2. Okratoksin A 11
2.2.1. Okratoksin A'nın Özellikleri 12
2.2.2. OTA Biyosentezi 13
2.2.3. OTA Oluşumunu Etkileyen Faktörler 13
2.2.4. OTA'nın Organizmadaki Değişim Süreci 16
2.2.4.1. Absorbsiyonu 16
2.2.4.2. Dokularda Parçalanması ve Metabolik Dönüşümü 16
2.2.4.3. Eliminasyonu ve Atılımı 16
2.2.5. Okratoksin A'nın Vücuttaki Etkileri 17
2.2.5.1. Okratoksin A'nın Akut Etkileri 17
2.2.5.2. Okratoksin A'nın Kronik Etkileri 18
2.3. Okratoksin A' nın Gıdalarda Varlığı ve Limitler 21

2.4. Üzüm ve Üzüm Ürünleri:....23
2.5. OTA Tayininde Kullanılan Yöntemler....28
2.5.1. İmmunokimyasal Yöntem....28
2.5.2. İnce Tabaka Kromatografisi....29
2.5.3.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi....29
3. GEREÇ VE YÖNTEM....30
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler....30
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler....30
3.3. Kullanılan Çözeltiler....32
3.3.1. Mobil Faz Çözeltisi....32
3.3.2. Fosfat Tamponu....32
3.3.3. Okratoksin A Standart Çözeltileri....32
3.3.3.1. Standart Çözelti....32
3.3.3.2. Ara Stok Çözeltileri....32
3.3.3.3. Çalışma Çözeltileri....32
3.4. Yöntem....32
3.4.1. Okratoksin A'nın HPLC ile Tayin Yönteminin Validasyonu....33
3.4.1.1. Doğrusallık....33
3.4.1.2. Doğruluk ve Kesinlik....33
Gün içi tekrarlanabilirlik....33
Günler arası tekrarlanabilirlik....33
3.4.2. Örneklerin Hazırlanması....34
3.4.2.1. Ekstraksiyon....34
3.4.2.2. Temizleme ve Zenginleştirme....34
3.4.2.3. Geri Kazanım Çalışmaları....34
3.4.2.4. Konfirmasyon....35
3.4.3. Örneklerin Analizi....35
4. BULGULAR....37
4.1. Validasyon Çalışmalarına Ait Bulgular....37
4.1.1. Doğrusallık....37
4.1.2. Doğruluk ve Kesinlik....38
4.1.2.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik....38
4.1.2.2. Günler Arası Tekrarlanabilirlik....38

4.2. Geri Kazanım Çalışmaları.....39
4.3. Konfirmasyon 41
4.4. Örneklerin Analizine Ait Sonuçlar 42
5. TARTIŞMA.....48
KAYNAKLAR.....55
ÖZGEÇMİŞ.....69

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Önemli mikotoksinler, üretici küfleri, sorunlu ürünler ve etkileri 10
Tablo 2-2: OTA üreten cinslere ait türler 15
Tablo 2-3: Çeşitli hayvan türlerinde toksinin veriliş şekillerine göre LD_{50} düzeyleri 18
Tablo 2-4: Türk Gıda Kodeksi'nde yer alan OTA limitleri 25
Tablo 3-1: HPLC aletinin kromatografik çalışma koşulları 33
Tablo 4-1: OTA kalibrasyon eğrisine ait ortalama pik alanları ve CV değerleri 37
Tablo 4-2: Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları 38
Tablo 4-3: Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları 38
Tablo 4-4: Ortalama geri kazanım değerleri ve değişim katsayıları 39
Tablo 4-5: Kuru üzüm örneklerindeki OTA düzeyleri 44
Tablo 4-6: Pekmez örneklerindeki OTA düzeyi 44
Tablo 4-7: Üzüm suyu örneklerindeki OTA düzeyi 47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Mikotoksinlerin insan ve hayvanlara geçiş yolları 7
Şekil 2-2: OTA'nın kimyasal yapısı 12
Şekil 2-3: OTA'nın biyosentezi 14
Şekil 3-1: İmmunoaffinite kolonda temizleme işlemi 35
Şekil 3-2: Üzüm ürünlerinin ekstraksiyon aşaması 36
Şekil 4-1: OTA kalibrasyon eğrisi (Standart çözeltiler) 37
Şekil 4-2: OTA kalibrasyon eğrisi (geri kazanım çalışmaları) 39
Şekil 4-3: OTA standartına ait kromatogram (5 ng/mL) 40
Şekil 4-4: OTA tespit edilmeyen pekmez örneğinin kromatogramı 40
Şekil 4-5: 10 ppb katım yapılmış pekmez örneğinin kromatogramı 41
Şekil 4-6: OTA standartına (a) ve OTA-metil esterine (b) ait kromatogramlar 42
Şekil 4-7: OTA tespit edilmemiş kuru üzüm örneğine ait kromatogram 43
Şekil 4-8: 2,59 ppb OTA tespit edilmiş kuru üzüm örneğine ait kromatogram 43
Şekil 4-9: OTA tespit edilmemiş pekmez örneğine ait kromatogram 45
Şekil 4-10: 4,9 ppb OTA tespit edilmiş pekmez örneğine ait kromatogram 45
Şekil 4-11: OTA tespit edilmemiş üzüm suyu örneğine ait kromatogram 46
Şekil 4-12: 1,9 ppb OTA tespit edilmiş üzüm suyu örneğine ait kromatogram 46

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

OTA: Okratoksin A

A_w: Su aktivitesi

ELISA: Enzim bağlanmış immunsorbant deney, 'Enzim linked immunosorbent assay'

TLC: İnce tabaka kromatografisi, 'Thin layer chromatography'

LD_{50}: Bir ilacın verildiği popülasyonda bireylerin %50'sini öldüren miktar

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, 'High performance liquid chromatography'

WHO: Dünya Sağlık Örgütü, 'World Health Organization'

BEN: Balkan Endemik Nefropatisi, 'Balkan Endemic Nephropathy'

BUN: Kan üre azotu, 'Blood ure nitrojen'

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü, 'The International Agency for Research on Cancer'

OATP: Organik anyon taşıyıcı protein, 'Organic anion transporting polipeptid carrier'

SCF: Avrupa Birliği Gıda Bilimsel Komitesi, 'Scientific Committee on Food'

JEFCA: Dünya Sağlık Örgütü'nün gıda katkı maddeleri ile ilgili uzman komitesi, 'WHO Expert Committee on Food Additives'

AFB1: Aflatoksin B1

AFB2: Aflatoksin B2

AFG1: Aflatksin G1

AFG2: Aflatoksin G2

AFM1: Aflatoksin M1

ÖZET

Ünal AS. Kuru Üzüm ve Ürünlerinde Okratoksin A Varlığının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2009.

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, gıda maddelerinde ve hayvan yemlerinde bulunabilen en tehlikeli bulaşıcılardan biri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle gıdalarda ve yemlerde OTA düzeylerinin araştırılması ve insanların bu toksine maruziyetlerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada; İstanbul'da satışa sunulan üzüm ve üzüm ürünlerinde OTA varlığı, ekstraksiyon ve immunoaffinite kolon ile temizlemenin ardından ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile tayin edilmiştir. Analizler fluoresans dedektörü ile eksitasyon dalga boyu 333 nm ve emisyon dalga boyu 460 nm'de, mobil faz olarak su: asetonitril: asetik asit (99:99:2, v:v:v) karışımı kullanılarak, 1mL/dak akış hızında izokratik olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışılan 50 kuru üzüm ve 10 üzüm suyu örneğinin 6 tanesinde 0,19-2,59 ppb aralığında OTA'ya rastlanmıştır. 25 adet pekmez örneğinin 21 tanesinde (%84) 0,55 ppb-4,90 ppb aralığında değişen değerlerde, bir örnekte ise tayin sınırının altında OTA tespit edilmiştir. 12 pekmez örneğinde saptanan OTA değerleri, Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Gıda Bilimsel Komitesi tarafından izin verilen maksimum değerlerin üzerindedir. Saptanan en yüksek OTA değeri 4,90 ppb, ortalama değer ise 1,83 ppb'dir.

Anahtar Kelimeler: Okratoksin A, Üzüm ve ürünleri, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, İmmunoaffinite kolon, Mikotoksin

ABSTRACT

Ünal AS. Determination of OTA in Grape and Grape Products. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis. İstanbul. 2009.

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 tract tumors in Agypt and Tunisia.

OTA has been dedected in diverse food and feed commodities and so it has an increasing attention world-wide because of the hazard it poses to human and animal health.

In this study, the quantity of OTA in grape and grape products sold in İstanbul was studied on using HPLC. The method based on immunoaffinity column for clean-up and high-performance liquid chromatography with a mobile phase of acetonitrile:water:acetic acid (99:99:2) at a flow rate of 1 mL/min. Detection was with a fluorescence dedector with excitation 333 nm and emission 460 nm.

According to the analyses results of 50 dried grapes and 10 grape juice samples, OTA was found in 6 samples between 0.19 to 2.59 ppb. Also, in 21 (%84) of 25 pekmez samples it was dedected between 0.47 ppb to 4.90 ppb. The OTA contamination in 12 samples is much higher than the limit value of 2 ppb as defined in the Turkish Food Codex and EU Scıentıfic Committee on Food. 1 sample had no dedectable OTA contamination. The maximum concentration of OTA in samples was found 4.90 ppb and the mean concentration was found 1.83 ppb.

Key Words: Ochratoxin A, Grape and grape products, High performance of liquid chromatography, Immunoaffinity column, Mycotoxin

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler, çeşitli küfler tarafından salgılanan ikincil metabolitler olup, insanlar ve hayvanlarda istenmeyen patolojik ve fizyolojik değişiklikler meydana getirirler (1).

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, teratojenik etkilere sahip olduğunu, bazılarının bu etkilerin birkaçını birden gösterdiğini ortaya koymuştur. Mikotoksinlerin çoğu *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsleri tarafından sentezlenmektedir (2-4). Okratoksin A (OTA) , *Penicillium verrucosum* ve *Aspergillus ochraceus* gibi bazı küf türleri tarafından üretilen bir mikotoksin türüdür. Peptid bağı ile fenilalanine bağlanmış bir isokumarin türevi olan OTA'nın oluşumunu belirleyen en önemli iki faktör sıcaklık ve nemdir. *Aspergillus* türleri yüksek nem ve sıcaklıkta (12-37°C) toksin sentezlerken, *Penicillium* türleri daha düşük sıcaklıklarda bile (4-31 °C) toksin üretebilmektedirler (5-8).

OTA ilk kez mısırda doğal bulaşan olarak tespit edilmiştir. 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 OTA'ya rastlanmaktadır. Çeşitli ülkelerde tahıl ürünlerinde yapılan taramalarda saptanan OTA değerleri ürüne göre farklılık göstermekte ve 5-27500 ppb gibi geniş bir aralıkta değişmektedir (9-18).

OTA bütün memelilerde akut ve kronik lezyonlara sebep olan önemli bir nefrotoksindir. Fare, sıçan, hamster ve tavuklarda etkili bir teratojendir. İn vivo ve in vitro sistemlerde mutajen etkisi kanıtlanmış, ancak etki mekanizması henüz açıklanamamıştır. Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından, insanda muhtemel karsinojen madde (Grup 2B) olarak sınıflandırılmıştır. OTA, mikroorganizma ve sıçanlarda, mRNA'da protein sentezini ve tRNA sentetazı inhibe eder (19-20). Ayrıca OTA, başta Balkan ülkelerinin 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. Özellikle

35-55 yaş grubu kadınlarda daha sık görülen BEN'in semptomları zayıflık, iştahsızlık, belde kronik ağrılarla birlikte böbrek fonksiyon bozukluğu ve proteinüridir. BEN sebebiyle ölen hastaların, otopsilerinde interstisyel fibroz, tübüler dejenerasyon ve korteksin yüzeysel bölgelerinde glomerüler hiyalizasyon şeklinde histolojik lezyonlara rastlanmıştır (21-25). 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, diğer yandan da gıda maddelerindeki dağılımlarını ortaya koyacak tarama ve izleme programlarına yönelmektedir (26). Ülkemizde gıda olarak tüketilen ürünlerde mikotoksin kalıntılarının araştırılmasına yönelik çalışmalar ilk kez 1967 yılında Kanada'ya ihraç edilen fındıkların aflatoksin içermeleri nedeniyle iade edilmesinden sonra başlamıştır. Türkiye'de 1997 yılında yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde (27) mikotoksinlerden sadece aflatoksinler, patulin ve ergot alkaloidleri için limit değerlere yer verilirken, 2002 yılında yayımlanan "Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Belirlenmesi Hakkında Tebliğ" ile 3 üründe OTA için maksimum seviye bildirilmiştir (28). 26879 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan 17/05/2008 tarihli 2008/26 numaralı tebliğ ile de gıda maddelerindeki OTA'nın maksimum limitleri yeniden belirlenmiştir (29).

Yüksek toksisitesi nedeni ile OTA, günümüzde gıda maddelerinde ve hayvan yemlerinde bulunabilen en tehlikeli bulaşıcılardan biri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle gıdaların ve yemlerin OTA yönünden kontrolü büyük önem taşımaktadır. Özellikle ülkemizde üretilen ve %42'lik bir pazar payıyla dünya ticaretinde önemli bir ihraç ürünü olan kuru üzüm ve ürünlerinde OTA seviyesini gerçekçi biçimde ortaya koymaya yetecek yeterli sayıda sağlıklı veri bulunmamaktadır. 1996 yılında İsviçre'de yapılan bir çalışmada farklı coğrafik kökenli şarap örneklerinde OTA'nın saptanması ile üzüm ürünlerindeki toksinlerin denetimi arttırılmış, bu da üzüm ihracatında zaman zaman sıkıntıların yaşanmasına sebep olmuştur. Avrupa Birliği'ne üyelik sürecine henüz girmiş olan ülkemizde üzüm ve üzüm ürünlerinde OTA analizi ile ilgili yapılacak bir araştırmanın Türkiye'deki gıdaların OTA açısından mevcut durumunun ortaya konmasına katkısı olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, ülkemizin önemli ihraç ürünlerinden olan ve beslenme açısından büyük önem taşıyan kuru üzümde; ülkemize özgü geleneksel ürünlerimizden

biri olan ve içerdiği minerallerin yanında iyi bir enerji kaynağı olması nedeniyle özellikle çocukların beslenmesinde tercih edilen pekmezde ve yine üzümden elde edilen ve son yıllarda tüketimi yaygınlaşan üzüm suyunda OTA analizi yaparak bu ürünlerin içerdikleri OTA seviyelerini belirlemektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Gıdalar üretimlerinden tüketimlerine kadar geçen süreç içerisinde çeşitli faktörlerin etkisiyle bozulmaktadırlar. Bozulmaya neden olan faktörler içerisinde küfler, değişik çevre şartlarına dayanıklılık göstermeleri nedeniyle önem taşımaktadırlar. Küfler (funguslar), doğada toprak, su, hava ve organik kalıntıların mikroflorasında yaygın olarak bulunan, klorofil içermeyen, heterotrofik organotrof mikroorganizmalardır. Saprofilik özellikleri ile birçok organik maddeyi kullanarak büyüme ve çoğalmaları için gerekli yapıları, dışarıya ihtiyaç duymadan sentezleyebilirler ve bu özellikleri sayesinde koruyucu tabakaları zarar görmüş olan bir çok gıda maddesi üzerinde kolayca kolonize olabilirler. Küfler gıdalarda yumuşamaya neden olan reaksiyonları katalizleyen ekstrasellüler proteolitik ve lipolitik enzimlere sahiptirler. Bu sayede ortama çeşitli enzimler salgılayarak kompleks organik yapıları daha basit yapılara çevirirler. Bu basit yapılar daha sonra küfler tarafından hücre yapıları için gerekli olan katabolik ve anabolik sentezlerde kullanılırlar. Kullanım sonrası ortaya çıkan ürünler birincil ve ikincil metabolitler olarak ikiye ayrılırlar (30-32).

Mikotoksinler, küfler tarafından üretilen, insan ve hayvanlara toksik etkileri olan ikincil metabolizma ürünleridir. Küflerin ve diğer organizmaların birincil metabolitleri, büyümeleri için esansiyel olan metabolitlerdir. İkincil metabolitler ise sentezleyen organizmanın metabolizması ya da gelişimi üzerine belirgin bir öneme sahip olmayıp, eksponensiyel büyüme fazı sonunda oluşmaktadır. Küflerde ikincil metabolitlerin sentezlenme yolları; poliketit, terpenoid ve temel aminoasitlerin kullanımı şeklindedir. Mikotoksinler poliketit yoluyla sentezlenmektedirler. Üretilen mikotoksin miktarı küflerin üzerinde büyüdükleri substrata, küfün türüne, bitki ve çevre etkenlerine göre değişebilir (33-35).

Mikotoksinlerin kimyasal yapıları incelendiğinde çoğunun aromatik yapıda olduğu, daha az bir kısmının da alifatik bileşiklerden oluştuğu görülür. Genellikle yüksek sıcaklıklara dirençlidirler. Genellikle kendilerinin sentezledikleri toksinlerden olumsuz etkilenmezler. Mikotoksinler bakteri toksinlerinin aksine küçük moleküllü bileşikler olduğundan bunların immunolojik yöntemlerle belirlenmesinde poliklonal

antikorlar (antiserumlar) yeterli olur. Oysa bakteriyel toksinlerin belirlenmesinde monoklonal antikorlara gereksinim vardır. Bazı mikotoksinler endotoksin olarak misel içinde birikirken, birçoğunun miselden substrata doğru salgılandığı ve difüze olduğu görülür. Bu nedenle küflü gıda ve yemlerden miseller uzaklaştırılsa bile ürünün mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmaz.

Günümüzde 100'den fazla küfün 300 civarında toksik etkiye sahip ikincil metabolitler ürettiği tahmin edilmektedir (36). Bunlardan çok az bir kısmı yaygın olarak görülmektedir. Yaygın olarak bilinen mikotoksinler, *Aspergillus* cinslerinin oluşturduğu aflatoksinler, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinin oluşturduğu OTA ve patulin, *Fusarium* cinsine giren küflerin ürettikleri mikotoksinler (deoksinivalenol, zearalenone, T-2 ve HT-2 toksinleri) ve fumonisinler şeklinde sıralanabilir (37). Mikotoksinlerin ortaya çıkma sıklıkları ülke ve bölgelere göre farklılık göstermektedir. Örneğin, ABD'de mısırda fumonisin birinci derecede önemli mikotoksinler arasında değerlendirilirken, Avustralya'da mısır beslenmede fazla kullanılmadığından önemli bir tehlike olarak görülmemektedir. İklim koşullarının uygun olmaması ve ithal gıdalarda denetimin sıkı olması nedeniyle Avrupa'daki tüketiciler için aflatoksin ciddi bir tehdit oluşturmazken; ABD dahil olmak üzere Amerika, Afrika ve Asya kıtalarındaki pek çok ülke ve Türkiye için önemini halen korumaktadır.

Mikotoksinler üzerine yapılan ilk çalışmalar 1960'lı yıllarda başlamıştır. Bu tarihe kadar tarımsal ürünlerin küflenmesi sadece ekonomik yönden problem yaratırken, 1960 yılında; oral alımlarla canlılarda çok kuvvetli toksik etki gösteren, aynı zamanda kanserojen özellikte, aflatoksin adı verilen bir metabolitin keşfinden sonra mikotoksinler yoğun araştırılan bir konu olmuştur. 1960 yılında İngiltere'de 100 000 hindi palazının, ABD' de 1 000 000 alabalığın ani ölümü şaşkınlık yaratmış ve hastalığa "Turkey X hastalığı" ismi verilerek nedenleri araştırılmıştır. Sonunda hindi palazlarının yemlemesinde kullanılan Brezilya kökenli küflü yer fıstığı küspesinden *Aspergillus flavus* izole edilmiş ve onun metaboliti olan difurankumarin yapının ölüme neden olduğu gösterilmiştir. Araştırmalar kapsamında bu fungusun geliştiği yem maddeleri tavuk ve hindi yavrularına yedirilmiş, aynı hastalık semptomları izlenmiş ve hastalık kısa sürede ölümle sonuçlanmıştır. Bu metabolite kökenini belirtmek için aflatoksin adı verilmiştir. Aflatoksinin bulunuşu ile toksik etkiye sahip ikincil metabolitler önem

kazanmış ve yıllardır üzerinde sayısız araştırmaların yürütüldüğü oldukça geniş bir madde grubu oluşmuştur (38).

2.1.1.Mikotoksikozis

Mikotoksikozis, mikotoksin içeren su veya çeşitli gıda maddelerinin sindirim sisteminden vücuda girdikten sonra toksinin türü, miktarı, alınma süresi ve çevresel koşullara bağlı olmak üzere, açık veya gizli enfeksiyonlarla ortaya çıkan bir hastalıktır. Mikotoksinlerin insanlara geçiş yolu doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki şekilde olmaktadır

İnsanlar ve hayvanlar doğrudan mikotoksin ile bulaşmış gıda ve yem maddelerini tüketerek mikotoksinleri bünyelerine alırlar ve bunun sonucunda oluşan mikotoksikozise "primer mikotoksikozis" adı verilmektedir.

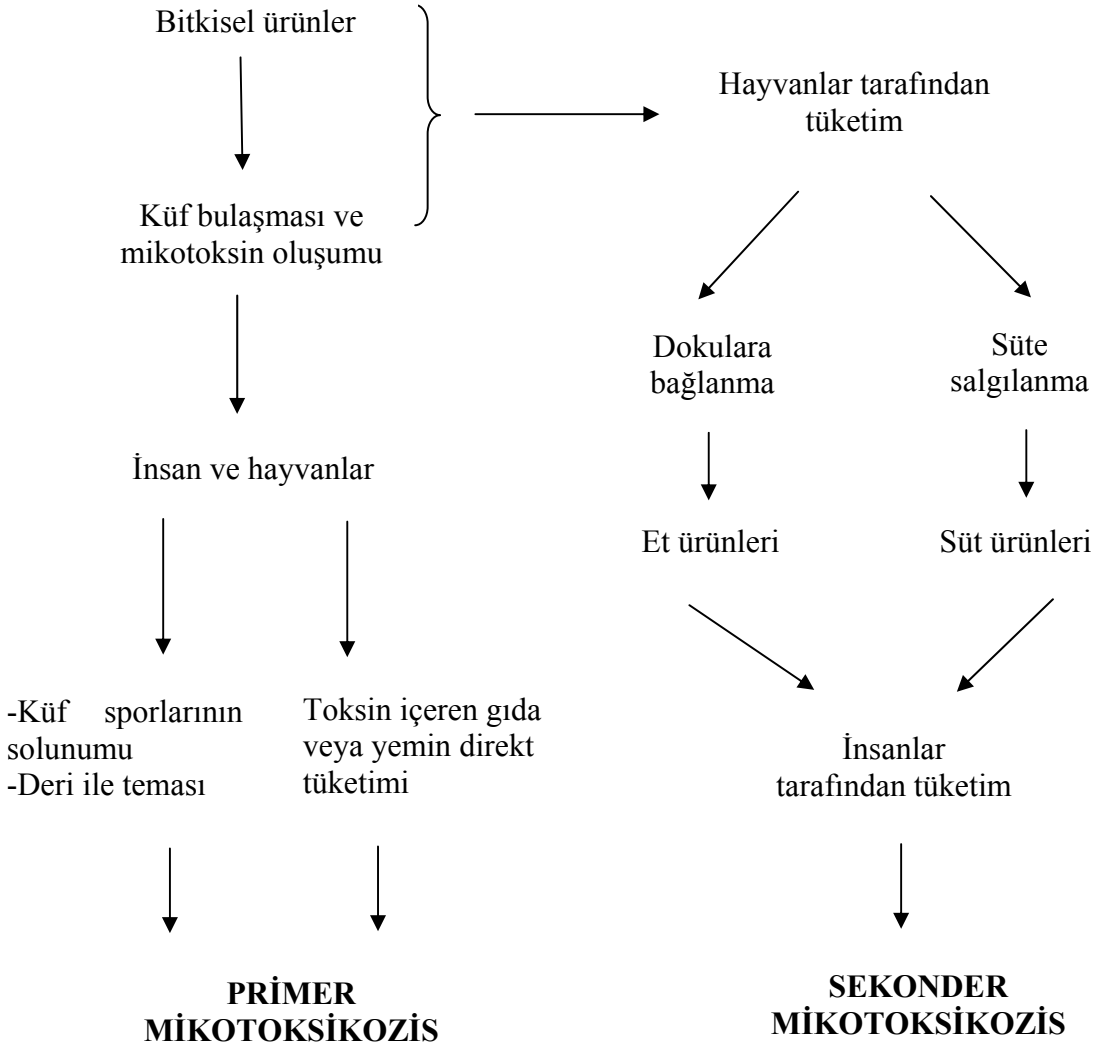
Mikotoksin bulaşmış yem ile beslenen hayvanların et, süt ve yumurta gibi ürünlerine bu toksinler geçmekte ve hayvansal ürünlerin tüketilmesi sonucu da mikotoksin dolaylı olarak insanlara geçebilmektedir. Bu şekilde oluşan mikotoksikozise ise "sekonder mikotoksikozis" adı verilmektedir.

Doğru ve dolaylı yoldan mikotoksinlerin insanlara geçiş yolu Şekil 2-1'de gösterilmektedir.

Kayıtlara geçen ilk mikotoksikozis vakası MS 943 yılında Fransa'da görülmüştür. *Claviceps purpurea*'nın salgıladığı mikotoksin türevi olan ergot alkaloidleri ile enfekte olmuş çavdar ve diğer hububatların tüketilmesi sonucu 40 000 kişi ölmüştür. Halüsinasyon, deliryum, konvülsiyon ve gangren tipte belirtiler gösteren hastalık ergotizm (St. Anthony's Fire) adı ile tarihe geçmiştir.

Yine 2.Dünya Savaşı'nda, 1942-1944 yılları arasında Rusya'nın Orenburg bölgesinde binlerce insanın ölümü ile sonuçlanan mikotoksikozis olayı "Alimentary Toxic Aleukia, ATA" (beslenmeye bağlı toksik etki ile kanda lökosit sayısının düşmesi sonucu oluşan lösemi) olarak tarihe geçmiştir. Hastalık kişilerde parmak, dudaklar ve ağız mukozasında ülserler, ateş, burun, boğaz ve dişetlerinin kanaması, dermal nekroz, sepsis, lökopeni, agranülositoz, hemoraji, kemik iliği depresyonu ve hematopoetik sistem bozukluklarına sebep olmuştur. Bu hastalığa, savaş nedeniyle zorunlu olarak tarlada hasadı tamamlanmamış tahılların kış boyunca kar altında kalması ve bahar mevsiminde toplanarak gıda olarak kullanılmasının yol açtığı anlaşılmış ve tahıllar

üzerinde üreyen *Cladosporium, Alternaria, Penicillium, Mucor* ve özellikle de *Fusarium* türlerinin oluşturduğu mikotoksinlerin ölüme neden olduğu belirlenmiştir. Bugün *Fusarium*'un T-2 toksininin yanında trikotesenlerin de ölümlerde rol oynadığı bilinmektedir (31, 39-41).



Şekil 2-1: Mikotoksinlerin insan ve hayvanlara geçiş yolları

2.1.2.Mikotoksikozise Neden Olan Küfler

Gerek çevre şartları, gerekse gıda maddelerinin çeşidine bağlı olarak bir çok üründe çok sık rastlanılan küf türleri vardır. Gıdalarda en çok rastlanılan ve mikotoksin üreten küfler *Aspergillus*, *Penicillum, Fusarium, Alternaria* vb. cinsleridir (30).

Aspergillus, çoğu mikotoksin üretme kapasitesine sahip, 100'den fazla türü içeren geniş bir cinstir. Sıcak ve tropik bölgelerdeki tahıllar ve yağlı tohumlar gibi tarım

ürünlerinde yoğun olarak oluşurlar. *A.flavus* ve *A.parasiticus* aflatoksin, *A.ochraceus* okratoksin, *A.versicolor* sterigmatosistin gibi toksinleri üreten önemli türlerdir (42). Bunlardan gıda ve yemlerdeki en toksik metabolitlerden olan aflatoksin insanlar ve hayvanlarda başlıca immun sistemi baskılayabilmekte ve özellikle karaciğerde kanser oluşumuna yol açabilmektedir. Aflatoksin B1 (AFB1), Aflatoksin B2 (AFB2), Aflatoksin G1 (AFG1), Aflatoksin G2 (AFG2), Aflatoksin M1 (AFM1) bu grubun en önemli toksinleridir.

Diğer bir önemli depo küfü ise, yüksek sıcaklık ve neme sahip tropik bölgelerde oluşan *Penicillium*'dur. 150 den fazla türe sahip olan *Penicillium'un* yaklaşık 100 türünün toksin ürettiği belirtilmiştir.

Bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsleri tarafından üretilen okratoksinler de mikotoksikozise neden olmaktadır. Uygun koşullar altında çeşitli tahıllar, yemler, baklagiller, meyveler üzerinde üreyen ve 3 ayrı türü bulunan okratoksinlerin en toksik metaboliti OTA'dır.

Patojen bir küf olan *Fusarium* bitkilerin büyümesi sırasında ortaya çıkar ve 70'den fazla farklı toksin üretir. Bunlardan en önemlileri fumonisin, deoksinivalenol (DON), zearalenon ve trikotesenler (T-2 toksin veya vomitoksin)'dir. *Fusarium* Afrika, Asya ve Kuzey ve Güney Amerika'da tahıllarda (buğday, arpa, mısır) bozulmaya neden olan baskın bir küftür.

2.1.3.Mikotoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ortaya çıktıktan sonra, bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Mikotoksinler içinde insan sağlığı üzerine en etkili olanlar aflatoksinler, trikotesenler, fumonisinler ve OTA' dır. Canlılarda alınan mikotoksin dozuna bağlı olarak iki farklı etki görülebilir. Yüksek dozda alındıklarında akut toksik etki meydana gelir ve gıda veya yemin tüketilmesinin ardından kısa sürede ölüm görülebilir. Akut toksik etkiye bireyin duyarlılığı, genetik ve fizyolojik özellikleri ve çevresel faktörler etkendir. Bazı mikotoksinler ölümden önce çok az belirgin semptomlar gösterirler. Bir kısmı ise deri nekrozları, lökopeni ve immunosupresif etkiler ile belirginleşirler ve ağır hastalıklara neden olurlar. Daha az dozların uzun süre alınmaları sonucunda ise kronik hastalıklar görülür. Bunlar; özellikle karaciğer, böbrek gibi organlarda hastalıklar, dejenerasyonlar, bağışıklık sisteminde

bozukluklar, kusurlu ve eksik organ oluşumları, deri nekrozları, üremede azalma ve kilo kaybı gibi bozukluklardır.

İnsan sağlığı açısından risk oluşturan mikotoksinlerden en önemlisi *A. flavus* tarafından üretilen AFB1'dir. İnsanda AFB1'in hepatokarsinojen etki yaptığı ortaya konmuştur. Karaciğer kanseri nedeni ile Çin ve Afrika'da yaklaşık olarak 250.000 ölüm gerçekleştiği, nedeninin ise günlük yüksek miktarda (1,4 µg) AFB1 alımı olduğu iddia edilmiştir. Dokularında aflatoksin tespit edilen çocukların aynı zamanda Kwashiorkor* ve Reye Sendromu'ndan şikayetçi olmaları, AFB1 bu iki hastalığın ortaya çıkışında bir etkisi olduğu şüphelerini uyandırmıştır.

İnsan sağlığına olumsuz etki eden diğer bir mikotoksin türü de OTA'dır. Balkan ülkelerinde sıkça görünen üst üriner bölgede epitel tümörlerin oluşmasında etkili olan OTA, aynı zamanda insanda B- ve T- lenfositlerinin bağışıklık sistemindeki etkisini de inhibe edici özelliği vardır.

WHO–IARC tarafından, mikotoksinler insanlara karşı kanserojenik potansiyellerine göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre; AFB1, "yeterli kanıt elde edilmiş insan kanserojenleri" (Grup 1A) grubunda yer alırken, AFM1 ve OTA "muhtemel kanserojenik mikotoksin" (Grup 2B) grubunda yer almıştır. Diğer yandan trikotesen ve zearalenon için insanlara karşı kanserojenik etkisinin bulunmadığı (Grup 3B) belirtilmiştir. Tablo 2-1'de önemli mikotoksinler, üretici küfleri, sorunlu ürünler ve etkileri gösterilmektedir (31, 36, 43-45).

2.1.4.Mikotoksin Üretimini Etkileyen Faktörler

Küflerin çoğalması ve mikotoksin üretimi küf türü, bitki ve çevre etkenlerinin birlikte etkileri sonucu meydana gelir. Gıda ve yemlerde gelişen küflerin gelişme sürecini tamamladıktan sonra miselleri içerisinde oluşturdukları ve birçok durumda üzerinde bulundukları ürüne (substrata) salgıladıkları toksik metabolitler oluştururlar.

*Kwashiorkor: Protein yetersizliğine bağlı gelişen kas erimesi. Bağışıklık sistemi zayıflamasına yol açan protein enerji malnütrisyonu.

Tablo 2-1: Önemli mikotoksinler, üretici küfleri, sorunlu ürünler ve etkileri

Mikotoksin	**Üretici küf**	**Ürün**	**Memeli Hayvanlara Etkileri**
AFB1 AFM1	*Aspergillus flavus,* *A. parasiticus*	Mısır, buğday ve yerfıstığı, kabuklu yemişler, incir, baharatlar, soya fasulyesi, pamuk tohumu yağı, çekirdek, kurutulmuş hindistan cevizi, süt ve süt ürünleri	Hepatotoksik, kanserojen, teratojen
OTA	*Aspergillus ochraceus,* *A. carbonarius,* *A. niger* *P. verrucosum* *P. citrinum*	Tahıl ve tahıl ürünleri, bakliyat,kuru meyveler, içecekler, baharatlar, yerfıstığı	Nefrotoksik, hepatotoksik, teratojen, immunosupresif
Sitrinin	*P. citrinum,* *P. expansum,* *P. verrucosum*	Buğday,çavdar,pirinç, mısır, meyve suları	Nefrotoksik, nörotoksik
Patulin	*P.expansum,* *Byssochlamys nivea*	Küflü meyve, sebze, tahıllar ve diğer gıdalar	Nörotoksik
Sterigmatosistin	*A. versicolor,* *A. rugolosis*	Hububat, kahve	Kanserojen
Trikotesenler (T-2 Toksin)	*Fusarium sporotrichioides,* *F. poae*	Buğday,mısır, saman	Düşük dozlarda kusma, lökopeni, deri nekrozları
Zearalenone	*Fusarium graminearum,* *F. culmorum,* *F. equisetti*	Mısır, buğday, arpa, yulaf	Östrojen benzeri etki

Mikotoksin üretimi etkileyen faktörler şu şekilde sıralanabilir:

1) Tarım ürünün ve gıdanın çeşidi

2) Ürünün yetiştirildiği ortamın nem içeriği, sıcaklığı, pH'sı (%70'den fazla nem ve 12–47 °C arasındaki sıcaklık mikotoksin üretimi için optimum koşulları sağlamaktadır)

3) Ürünün olgunluk durumu, hasat işlemleri, depolama koşulları

4) Yetersiz gübreleme ve kuraklık

5) Ortamda diğer yarışmacı mikroorganizmaların varlığı

6) Mekanik işlemlerin ve böceklerin bitkilerdeki koruyucu yapıyı bozmaları küf üremesinin artmasına ve mikotoksin üretilmesine sebep olabilmektedirler (46, 47).

2.1.5.Türkiye'de Mikotoksin Sorunu

Türkiye'nin bulunduğu coğrafya, mikotoksin üreten küflerin üremesi ve toksin üretmesi için uygun iklim şartlarına sahiptir. Gıdalarda mikotoksinlerin varlığı önemli sağlık sorunlarına yol açtığından, başta Avrupa Birliği ülkeleri olmak üzere ithalatçı ülkeler, mikotoksinlerle ilgili limit değerleri sürekli olarak aşağıya çekmekte ve bu durum da özellikle tarımsal ürün ihraç eden ülkemiz için büyük ticari önem arz etmektedir.

Türkiye'de mikotoksin sorunu ilk kez, 1967'de Kanada'ya ihraç edilen fındıkların aflatoksin içermeleri nedeni ile geri gönderilmeleriyle gündeme gelmiştir. Yine 1971'de Amerika'ya ihraç edilen antepfıstıkları ve 1972'de Danimarka'ya gönderilen kuru incirler aflatoksin kapsadıkları gerekçesiyle geri gönderilmişlerdir. Bu olaylar, Türkiye'de başta AFB1 olmak üzere çeşitli mikotoksinlerle ilgili araştırmalarının başlamasına neden olmuştur. Elma sularında patulin, süt ve süt ürünlerinde AFB1 ve AFM1, hububat ve bakliyat ürünlerinde T-2 toksini ve deoksinivalenol, mısır ve mısır ürünlerinde ve bitkisel çaylarda fumonisin B1 ve B2, tahıl ve tahıl ürünlerinde OTA aranmasına yönelik mevcut çalışmalar vardır (48-59).

2.2. Okratoksin A

OTA, bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen, hayvan yemlerinde, insan gıdalarında ve bazı batı ülkelerinde insan kan örneklerinin %80'inde bulunmuş bir mikotoksindir. Hububatların, hububat ürünlerinin ve diğer bitkisel ürünlerin depolanması sırasında oluşur ve besin zincirine girer (60-64).

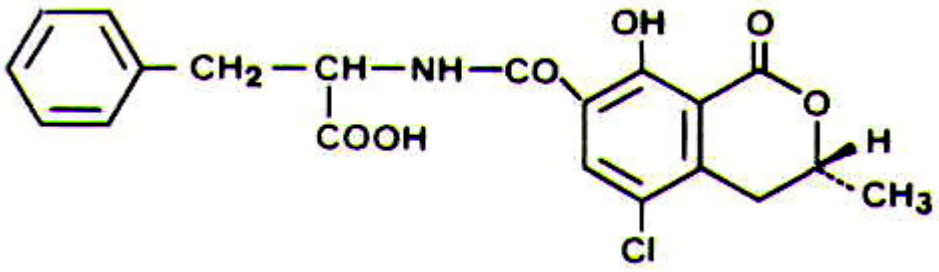
OTA ve daha az toksik dekloro analoğu olan Okratoksin B ilk kez 1965 yılında Güney Afrikalı kimyacılar tarafından tanımlanmış ve D.B. Scott tarafından sorgum tanelerinden izole edilen *Aspergillus ochraceus* K-804 suşundan izole edilmiştir (39). OTA'nın dünyanın çeşitli ülkelerinde baklagillerde, hububatlarda ve diğer bitkisel ürünlerde, hayvan yemlerinde, hayvan etlerinde ve insan dokularındaki varlığı saptanmıştır. OTA bitkisel ürünler içerisinde özellikle mısır, buğday, arpa, sorgum, yulaf, baklagiller, yer fıstığı ve karışık yemlerde bulunan en önemli mikotoksinlerden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca domuz dokularında da yaygın olduğu ve OTA

düzeyinin hayvansal ürünlerde hububatlardakilerden daha fazla olduğu bildirilmiştir (65-67).

2.2.1.Okratoksin A'nın Özellikleri

OTA, renksiz, kristalimsi, suda az çözünen, fakat sulu sodyum bikarbonatlı çözeltilerde çözünebilen, zayıf asidik özellikte bir bileşiktir. Ksilen ile yeniden kristalize edilebilir. Kristal formda, ultraviyole altında, asit solüsyonda yeşil ve alkalin solüsyonda mavi fluoresans verir, bu kristallerin erime noktası 169^{o}C'dir. OTA'nın serbest asidi polar organik çözücüler içinde çözülebilir. OTA, ışık ve havada dayanıklı değildir. Işık ve özellikle nemli koşullara maruz kaldığı zaman bozulabilir ve etkisini kaybedebilir. Etanol solüsyonunda karanlık ve soğukta muhafaza edildiği zaman, bir yıldan fazla dayanır. OTA, sıcağa karşı oldukça dayanıklıdır; hububat ürünlerinin otoklavda (121^{o}C, 1 atm) 3 saat kalması durumunda dahi toksinin %35'i etkinliğini sürdürür. Isıyla ayrıştırıldığı zaman toksinden klorun toksik buharı ve nitrik oksit ortama verilir. Normal koşullar altında okratoksin A ve B oluşturulur. Okratoksin B, OTA'dan daha az toksiktir ve karaciğer hücrelerinde protein biyosentezini inhibe etmez.

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 (68, 69). OTA, dihidro-metil-izokumarin halka sisteminde C5 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 ısıya ve hidrolize karşı çok dayanıklıdır (70-72). Şekil 2-2'de OTA'nın kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2-2: OTA'nın kimyasal yapısı

2.2.2.OTA Biyosentezi

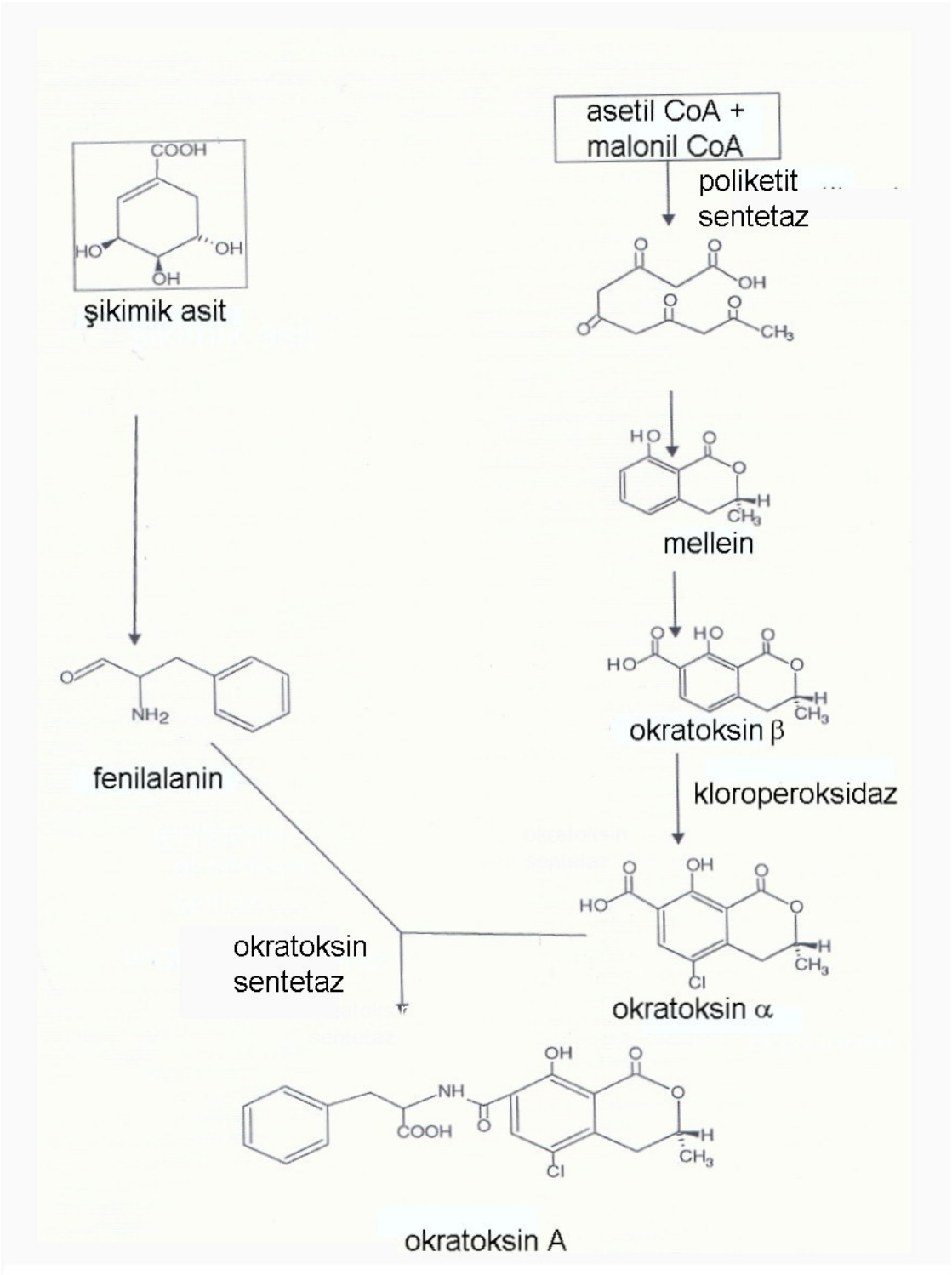
Okratoksinler, L-β fenilalanine amid bağı ile bağlı izokumarin türevleridir. Biyosentetik orijinine göre poliketidler grubu içinde pentaketitler olarak sınıflandırılmıştır. Pentaketitler, asetil ve malonil CoA'dan oluşurlar. Pentaketit, sikülizasyon ve aromatizasyon ile izokumarine dönüşür. Karboksi türevinin metilasyon, oksidasyon, klorinasyon ve asit aktivasyonları ile şikimik asit yolu sonrası oluşan fenil alanin ve fosfookratoksin A, OTA'yı oluşturmaktadır. Klorinasyon aşamasının kloroperoksidaz enziminin varlığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Kloroperoksidaz düşük substrat spesifitesi gösteren, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan iki yüzden fazla halojenlenmiş maddelerin biyosentezini uyaran bir enzimdir. OTA'daki klor fenolik gruba para formundadır. OTA biyosentezindeki iki ana kısmın (fosfookratoksin a ve fenilalanin etil esteri) oluşmasını, bunların birleşme reaksiyonları takip eder. Birleşme reaksiyonu, okratoksin sentetaz kompleksi ile olur, ATP ve Mg^{++} reaksiyon için gereklidir. Yapılan çalışmalar ışığında, okratoksinin beş türevi olduğu bilinmektedir. Bunlar; Okratoksin A, B, C, α ve β'dır. Bunların içinde toksik açıdan en önemlisi molekül ağırlığı 403,83; kimyasal formülü $C_{20}H_{18}ClNO_6$ olan OTA'dır. OTA'nın yarılanma ömrü; farelerde 24-39 saat, sıçanlarda 55-120 saat, domuzlarda 72-120 saat, maymunlarda 456-504 saat, insanlarda ise 840 saattir (3, 73, 74). Şekil 2-3'de OTA'nın biyosentezi özetlenmiştir.

2.2.3.OTA Oluşumunu Etkileyen Faktörler

OTA, çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* küfleri tarafından sentezlenir. OTA, adını Scott tarafından ilk kez izole edildiği *A. ochraceus*'tan alır (68). OTA üreten küfler Tablo 2-2'de verilmiştir.

Gıda ve yemlerde OTA üretiminde etkili olan birçok faktör bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları;

- su aktivitesi (a_w),
- sıcaklık,
- substratın cinsi,
- ortamda rekabetçi mikrofloranın varlığı,
- fungusun cinsi olarak sıralanabilmektedir (75-78).



Şekil 2-3: OTA'nın biyosentezi

Tablo 2-2: OTA üreten cinslere ait türler

***Penicillium* cinsine ait türler**	***Aspergillus* cinsine ait türler**
P. glabrum	*A. petrakii*
P. purpurrescens	*A. sulphureus*
P. commune	*A. sclerotiorum*
P. variabile	*A. alliaceus*
P. verrucosum	*A. melleus*
P. viridicatum	*A. ochraceus*
P. palitans	*A. ostianus*
P. cyclopium	
P. purpurogenum	

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.

OTA üretiminden sorumlu olan *Penicillium* ve *Aspergillus* küfleri ekolojik nişleri, etkiledikleri ürünler ve değişik coğrafik bölgelerde bulunma sıklıklarına göre farklılıklar göstermektedir.

A.ochraceus ile yapılan üretim çalışmalarında, optimal üremenin 20-30^oC arasında olduğu görülmüştür. En yüksek üretimin 30^oC'de ve su aktivitesinin 0,95 olduğu tespit edilmiştir. Düşük sıcaklıklarda nem gereksinimi yüksektir. Örneğin 15^oC'de su aktvitesi 0,997 veya nem oranı %52'dir.

Penicillium cinsi, düşük sıcaklıklarda gelişebilen türleri içerir. Düşük inkübasyon sıcaklıklarının etkilerinin araştırılması, *P.viridicatum* suşlarının, 5-10^oC'de OTA üretebildiklerini göstermiştir. Bunlar için a_w değeri 0,95-0,99 arasındadır. 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 *A. ochraceus* türlerinin sorumlu olduğunu ileri sürülmektedir (79-81).

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 Organizmadaki Değişim Süreci

2.2.4.1.Absorbsiyonu

OTA'nın vücuda girişinden sonraki absorbsiyon yerinin tespit edilmesi, toksinin vücuttaki seyri ve yapacağı ilk etkilerin belirlenebilmesi için oldukça önemlidir. OTA'nın vücuttaki absorbsiyon yerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada (82), sıçanlara tek dozda verilen 10 mg/kg OTA, 4 saat sonra mide duvarından izole edilmiş, ince ve kalın bağırsaklarda değişmeden ve az miktarda kaldığı belirlenerek toksinin absorbsiyon yerinin mide olduğu ileri sürülmüştür.

OTA'nın absorbsiyon yerinin belirlenmesi üzerine yapılan bir başka çalışmada da (18), OTA'nın absorbsiyon yerinin mide olduğu ve hatta midedeki asidik ortamın toksinin emilimini kolaylaştırdığı, toksinin maksimum absorbsiyon yerinin jejunum olduğu ve portal ven yoluyla lenfatik sisteme taşındığı belirlenmiştir (83-86).

2.2.4.2.Dokularda Parçalanması ve Metabolik Dönüşümü

OTA içeren yemlerle beslenen domuzlarla yapılan çalışmada, toksin artıkları başlıca böbrek, karaciğer, kas ve adipoz dokuda bulunmuştur. Sıçanlara 10 mg/kg OTA uygulmasından 96 saat sonra, uygulanan dozun böbrekte %0.3'ü, karaciğerde %0.9'u, toplam kas dokusunda %0.6'sı tespit edilmiştir (87-90).

2.2.4.3. Eliminasyonu ve Atılımı

OTA, vücuda alındıktan sonra bir kısmı değişmeden, bir kısmı da metabolitleri şeklinde gaita ve idrar yoluyla atılmaktadır. OTA'nın vücuttan atılımını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada (91), sıçanlara oral yolla verilen OTA'nın idrarda %6'sının OTA şeklinde, %1.5'inin (4R)-4-hidroksiokratoksin A ve %25-27'sinin de Okratoksin α (Oα) şeklinde atıldığı belirlenmiştir. Çalışmada, gaitada %12 oranında OTA'nın değişmeden ve %9 oranındaki OTA'nın ise Oα şekline dönüştürülerek atıldığı tespit edilmiştir. Deneysel olarak, oral yolla verilen OTA'nın yarılanma ömrü, intravenöz enjeksiyona göre daha kısadır. Toksinin bir bölümünün eliminasyona uğradığı bölge karaciğerdir, daha sonra safrayla atılır ve sistemik kan dolaşımına girer. Karaciğerin temizlenmesi, karaciğer hücrelerinin membranında bulunan organik anyon taşıyıcı protein 'organic anion transporting polipeptid carrier' (OATP) ile gerçekleşir.

Eliminasyonun diğer önemli organı böbrektir. OTA plazma proteinine %99 bağlanma potansiyeli gösterir. Bu yüzden OTA glomerüler filtrasyonla ortamdan

uzaklaştırılamaz, daha çok tübuler eliminasyon ile üreye geçer. Bu sürece, proksimal tübül hücresinin bazolateral hücre membranındaki ksenobiotik taşıyıcılar aracılık eder. Proksimal tübül kökenli böbrek hücrelerinin, uzun süreli OTA'ya maruz kalması, hücrenin genel fonksiyonunu etkilememekle beraber organik anyon transportunu azaltır. Bu hücrelerden OTA'nın salgılanması azalırken, diğer ksenobiyotik taşıyıcıların ve ilaçların dışarı atılması da azalır. OTA, bütün nefron segmentlerinden geri emilir. Bu süreç toksinin böbrek dokusunda birikmesine ve toksisitesinin artmasına neden olur. Ara taşıyıcıların toksini kandan ayırması organizmanın toksik yükünü azaltır, fakat aynı anda böbrek ve karaciğer üzerindeki eliminasyon yükünde artışa neden olur. Safra kesesinden uzaklaştırılan toksini ayıran ince bağırsaklardır. Bu yüzden özel toksik etkileri bu organlarda gözlenir (92, 93).

2.2.5.Okratoksin A'nın Vücuttaki Etkileri

OTA ile ilgili toksisite çalışmaları incelendiğinde, OTA'ya maruz kalma süresine ve OTA miktarına bağlı olarak görülen etkilerin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir (94).

2.2.5.1.Okratoksin A'nın Akut Etkileri

Toksine kısa süreli olarak, ancak yüksek dozda maruz kalma sonucu etkilenen ilk organ böbrektir. OTA'nın kısa süreli olarak yüksek dozda alınması ile böbrek fonksiyonları ve morfolojisi büyük ölçüde etkilenmekte, böbreklerde ağırlık artışı, idrar hacmi ve kan üre azotu 'Blood Ure Nitrojen' (BUN) seviyesinde artış olduğu bildirilmektedir. Dahlman ve ark. (92) ise, bu bulgulara ilave olarak glukozüri ve proteinürinin de görüldüğünü bildirmişlerdir.

Çeşitli hayvan türlerinde toksinin veriliş şekillerine göre LD_{50} düzeyleri belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 2.3'de özet halinde sunulmuştur.

Elde edilen sonuçlar, akut toksisite yönünden OTA'ya en duyarlı hayvanların köpek ve domuzlar, en az duyarlı hayvanların ise sıçan ve fareler olduğunu ortaya koymaktadır.

Tablo 2-3: Çeşitli hayvan türlerinde toksinin veriliş şekillerine göre LD_{50} düzeyleri

Hayvan Türü	Uygulama yerine göre LD_{50} düzeyleri (mg/kg vücut ağırlığı)		
	Oral	Periton içi	Damar içi
Fare	46-58,3	22-40,1	25,7-33,8
Sıçan	20-30,3	12,6	12,7
Yeni doğan sıçan	3,9	-	-
Köpek	0,2	-	-
Domuz	1	-	-
Piliç	3,3	-	-

2.2.5.2.Okratoksin A'nın Kronik Etkileri

OTA'nın etkilerinin araştırıldığı uzun süreli çalışmalarda, hedef doku ve organlar incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada farelere rasyona ilave edilen 40 mg/kg OTA, 44 hafta boyunca hayvanlara yedirilmiş ve bu uygulamadan 5 hafta sonra yapılan incelemede, hayvanlarda karaciğer hücre tümörleri, böbreklerde kistik adenomalar ve solid hücre tümörleri gözlenmiştir (95).

Çeşitli araştırmalar OTA'nın, karsinojenik, genotoksik, teratojenik, immunotoksik ve nefrotoksik etkilerini ortaya koymuştur. DNA kırılmaları, protein sentezinin inhibisyonu ve glikoneojenezis, lipid peroksidasyonu, mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun bozulması, kanın pıhtılaşmasının engellenmesi ve apoptozise neden olması, OTA'nın insan sağlığı için büyük önem taşıdığını göstermektedir (96-101).

IARC 1993 yılında OTA'yı insanlarda muhtemel karsinojen sınıflandırması olan 2B grubu içerisine dahil etmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda böbrek ve karaciğerde tümörlerin gelişmesine yol açtığı bildirilmiştir. OTA'nın karsinojenik etkisi, lipid peroksidasyonunu arttırıp, serbest radikallerin açığa çıkmasına ve immun sistemin baskılanmasına bağlanmaktadır (102).

OTA, birçok doku ve organda olumsuz etkileri olan bir mikotoksin olmakla beraber asıl hedef böbreklerdir. OTA, başta Balkan ülkelerinin 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. 1970'li yıllarda OTA'lı yemlerle beslenen hayvanlarda görülen toksik etkilerle, bu endemik hastalığın klinik ve patolojik özellikleri arasında çarpıcı benzerliklerin görülmesi üzerine OTA ile BEN arasındaki ilişkiyi çözmeye yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. BEN sebebiyle ölen hastaların, otopsilerinde interstisyel fibroz, tübüler dejenerasyon ve korteksin yüzeysel bölgelerinde glomerüler hiyalizasyon şeklinde histolojik lezyonlara rastlanmıştır (21-25).

OTA'nın böbreklerdeki nefronlara olan özel toksik etkisi, Dahlman ve ark. (92) göre, OTA'nın proksimal tübül hücreleri ve bazolateral membranında organik anyon transport mekanizmasının bozulmasını indüklemesine bağlanmıştır. Ayrıca derialtı yolla verilen OTA'nın böbreklerde öncelikle muramidaz enzim seviyesinin düşürdüğü, ardından da laktat dehidrojenaz, alkalin fosfataz, glutamat dehidrojenaz ve asit fosfataz seviyelerini düşürdüğü belirlenmiştir (103).

Eski Yugoslavya ve Bulgaristan'da endemik bölgelerdeki nefropati hastalarının serumlarında %16-17 oranında OTA rastlanmış, kontrol gruplarında bu oran % 6-7 olarak bulunmuştur. BEN rastlanma sıklığının yüksek olduğu bölgelerde aynı zamanda idrar yolları tümörlerinin çokluğuna dikkat çekilmiş ve bu bölgede tüketilen gıda örneklerindeki OTA düzeyi ile BEN hastalarının kan ve idrar örnekleri arasında ilişkinin olduğu belirtilmiştir (67, 68).

Grosso ve ark. (104)tarafından yapılan bir diğer çalışmada, aralarında idrar kesesi tümörlerinin de bulunduğu 47 nefropati hastası ile başka hastalık şikayetleri ile hastanede yatmakta olan 62 hastanın serum örneklerinin karşılaştırılmasında nefropatik hastaların %14,9'unun serum örneklerinde 1,0 mg/mL'nin üstünde; diğer hastaların %3,2'sinde 1,0 mg/mL'nin üstünde OTA düzeyi tespit edilmiştir.

Özellikle böbrek ve karaciğer üzerinde neoplastik etkileri olan OTA'nın immun sisteme olan etkileri de oldukça fazladır. OTA, birçok hayvan türü üzerinde immun sistemin yapısal içeriğine doğrudan olarak etki etmektedir. Chang ve Hamilton (88), rasyonlarına 2-4 mg/kg OTA ilave edilmiş piliçlere 20 gün süreyle OTA verilmesinin lenfoid hücrelerin sayısında azalmaya sebep olduğunu tespit etmişlerdir.

OTA, belirli dozlarda alındığında birçok hayvan türünde anemiye sebep olmaktadır. Agawane ve Lonkar (105) çalışmalarında, OTA toksikasyonlarında görülen aneminin, kanda hemoglobin konsantrasyonunda değişime sebep olmadığını tespit etmişlerdir. Ancak eritrositlerdeki sayı ve hacim ile serum demir ve transferinin çözünürlüğü oranındaki azalmadan kaynaklanan hipokromik mikrositik anemi görülmüştür.

OTA, karaciğer fonksiyonları üzerinde de oldukça etkilidir. Storen ve ark. (106), sıçanlarda rasyona OTA ilave edilmesinden sonra yapılan glukoz tolerans testinde elde edilen değerlerin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kan-glukoz seviyesinin normal değerlere ulaşmadığını belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, OTA uygulanan grupta karaciğerdeki total karbonhidrat ve glukojen seviyeleri ile glikolitik enzimlerin aktivitesinde düşme gözlenirken glukoneojenik enzim seviyesinde ise yükselme kaydedilmiştir.

OTA; fare, sıçan, hamster ve piliçler için kuvvetli düzeyde teratojen etkilidir. Ancak domuzlarda OTA'nın teratojen etkisinin diğer türler kadar kuvvetli olmadığı bildirilmiştir. OTA'nın teratojenik etkilerinin türler arasındaki farklılığı, kan-plasenta bariyerindeki farklılıklar ile OTA'nın türler arasındaki duyarlılık farkıyla açıklanmaktadır (91, 107, 108)

Kontamine materyalle beslenmiş gebe hayvanlarda yapılan incelemelerde, OTA'nın fetusun özellikle merkezi sinir sistemi, göz ve iskelet yapısını etkilediği belirlenmiştir. Fare ve sıçanlarda gebelik döneminde günde iki kez oral yolla ve vücut ağırlığına göre 1 mg/kg gibi düşük dozda verilen OTA'nın fetusta önemli ölçüde malformasyonlara sebep olduğu belirlenmiştir. Gebe domuzlarda ise OTA'nın yüksek dozlarının fetusta herhangi bir patolojiye sebep olmadığı bildirilmiştir.

Toksinlerin büyük bir bölümünün genler üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. OTA'nın memeli hücreleri üzerine mutajenik etkisi olmamakla birlikte, zayıf düzeyde genotoksik etkilerinin olduğu bildirilmektedir (109).

OTA'nın, glikoz ve insulin metabolizması üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir. Waren ve Hamilton (110), OTA'nın, karaciğerde glikojenolizin siklik adenozin monofosfat'a bağlı protein kinazı aktive etmesi sonucu glikojen birikimine sebep olduğunu bildirmişlerdir (111).

OTA'nın, çeşitli biyokimyasal etkileri vardır. Mikroorganizmalarda (*Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Streptococcus faecalis*, mayalar) olduğu gibi, sıçan karaciğer hücrelerinde de tRNA sentetazın ve protein sentezinin inhibitörüdür. OTA'nın, tRNA sentetaz ve protein sentezi üzerindeki geri dönüşümlü inhibitör etkisi, fenilalanin tarafından engellenir, OTA'nın hasara yol açması, bu engellemenin ölçütü ile bire bir ilişkilidir. Farelerde akut intraperitonal etkisi, beraber enjekte edilen fenilalanin ile önlenmiştir. Bu bulgular hayvanlar üzerindeki kronik etkilerinin (nefropati), fenilalanin ile önlenebileceğini düşündürmektedir (112).

2.3. Okratoksin A' nın Gıdalarda Varlığı ve Limitler

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. 1999 yılında 143 no'lu Avrupa Birliği'nin Komisyon Direktifinde "Avrupa Birliği'ne üye ülkelerdeki insanların diyetlerle OTA alımının değerlendirilmesi" çalışmalarının düzenlenmesine karar verilmiştir. Bu kapsamlı çalışmanın 2002 yılında yayımlanan sonuçlarına göre OTA'nın bulaştığı ürünlerin dağılımı; tahıl ve tahıl ürünleri (%50), şarap (%13), kahve (%10), baharat (%8), bira (%5), kakao (%4), kuru meyve (%3) ve kümes hayvanlarının eti (%1) şeklindedir. Ancak ürünlerdeki toksin seviyelerinde ülkelere göre büyük farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, şarapta saptanan OTA düzeyi ülkelere göre 0,003-15,6 μg/kg arasında değişmektedir. Et örneklerinin %18'inde OTA'ya rastlanma oranının düşük olmasına karşın bazı ürünlerdeki OTA miktarının yüksek olduğuna dikkat çekilmektedir. Sonuçları değerlendiren Avrupa Birliği yayımladığı Komisyon Direktifleri ile çeşitli ürünleri kapsayan maksimum değerlerde düzenlemeler yapmıştır. Birliğin 446/2002 Direktiflerinde bu değerler tahıllar ve tahıl taneleri için 5 ppb; insanların tüketimine sunulmuş işlenmiş tüm tahıl ürünleri için 3 ppb; kuru üzüm çeşitleri için 10 ppb; şarap çeşitleri, şıra ve üzüm suları için 2 ppb olarak bildirilmiştir. Bebekler ve çocuklar için riskin çok daha fazla olduğu düşünülerek, 683/2004 Direktiflerine bebek mamaları ve tahıl ürünü, bebek ve çocuk gıdaları (0,5 ppb) ile tıbbi amaçla ve özellikle bebekler için kullanılan diyet ürünleri (0,5 ppb) de dahil edilmiştir (113).

Bugün OTA, gıda maddelerinde ve hayvan yemlerinde bulunabilen en tehlikeli bulaşıcılardan biri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, gıdaların ve yemlerin OTA

yönünden kontrolü büyük önem taşımaktadır. Ancak ülkemizde henüz OTA'ya maruziyet derecesinin ortaya çıkmasına yetecek sayıda araştırma yapılmamıştır. 1990-1994 yılları arasında Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na bağlı İl Kontrol Labaratuarlarına gelen örneklerde OTA seviyelerine bakılmış ve fındık ve mamulleri, yer fıstığı, incir ve kırmızı biberden oluşan toplam 114 örnekten 38'inde 10-120 ppb arasında OTA'ya rastlanmıştır. Kırmızı biberin en yüksek düzeyde OTA saptanan ürün olduğu bildirilmiştir (114). Bir diğer çalışmada 127 adet taze, kuru, toz ve pul biber örneğinin %55,12'sinde 0,55-126,81 ppb aralığında OTA bulunduğu bildirilmiştir (115).

İşlenmiş tahıl ürünleri OTA bulaşma riski yüksek olan ürünlerdir. 2002-2003 yılları arasında Ankara'daki marketlerden ve pazarlardan toplanan 25 ürün üzerinde yapılan incelemede, 24 üründe 0,27-4,07 ppb düzeyinde OTA belirlenmiştir (116).

Kayseri'de tüketilen un, pirinç ve bulgurda (25'er örnek) 145,66-1011,84 ppt arasında değişen miktarlarda OTA ölçülmüştür (117).

Benzer ürünleri içeren markalı ve markasız 120 adet tahıl örneğinin 11'inde (5 tarhana, 1 buğday unu, 1 mısır ve 2 müsli) OTA'ya rastlanmıştır (59). Tarhana örneklerinin dördünde OTA düzeyinin 5 ppb'nin üzerinde bulunmuştur. Toplumumuzun beslenme alışkanlığında önemli bir yeri olan ve kırsal kesimde halkın kendi imkanları ile hazırladığı, temelini yoğurt ve unun oluşturduğu tarhana, çeşitli işlemlerden sonra bezler üzerine serilerek gölgede kurutulup son şeklini almaktadır. Kurutma işlemlerinin sağlıklı bir şekilde yapılamaması sonucunda, ortamda oluşan uygun koşulların (ısı, rutubet) küf mantarlarının aktif hale geçirdiği ileri sürülmektedir. Karagözlü ve Karapınar tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada aşurelik buğday, mısır, mısır unu, yulaf gevreği, yulaf ezmesi, yulaf unu ve müsliden oluşan toplam 100 adet örneğin 4'ünde (1 aşurelik buğday, 2 mısır, 1 yulaf ezmesi) 0,27-9,84 ppb düzeyinde OTA tespit edilmiştir (39). 24 kahvaltılık tahıl, 24 tahıl bazlı bebek maması ve 35 bira örneğini kapsayan bir diğer çalışmada ise kahvaltılık tahılın %38'inde, tahıl bazlı bebek mamasının %17'sinde ve bira örneklerinin %14'ünde, sınır değerlerin altında OTA tespit edilmiştir (118).

OTA ile kontamine olan ürünlerden olan kahve ve kakao ile ilgili ülkemizde yapılmış olan tek çalışmada, rastgele örnekleme ile toplanan 44 öğütülmüş ve kavrulmuş kahve örneğinin 9 tanesinde 2 ppb'nin üzerinde OTA tespit edilmiştir (119).

Kurutulmuş meyveler her yaş grubu tarafından fazla miktarlarda tüketilen, iç ve dış piyasada da önemli ekonomik potansiyele sahip gıda maddeleridir. Diğer taraftan kuru yemişler, oluşumları ısı ve nem gibi faktörlere çok sıkı bağlı olan aflatoksinler ve OTA için riskli ürünlerdendir. Kuru incir üretim ve dış satımında ana ülke konumunda olmamıza rağmen son yıllarda aflatoksin ve OTA problemi nedeni ile sektörde önemli sıkıntılar yaşanmaktadır. Ege Üniversitesi ve TARİŞ AR-GE tarafından ortaklaşa yürütülmüş bir çalışmada, 1999, 2000 ve 2001 sezonu kuru incir örneklerinde OTA düzeyi araştırılmış, örneklerin %38,2' sinde 2-10 ppb arasında değişen düzeylerde OTA saptanmıştır. 2000 ve 2001 ürünlerinde oransal olarak düşüş olmakla birlikte (%1,8; %1,4) 100 ppb'nin üzerinde toksine rastlanmış olması tüketicilerin sağlığı ve incir ticareti açısından riskli bulunmuştur (120). Bir diğer çalışmada, 1988 üretim sezonunda toplanan 282 incir örneğinin 16'sında OTA (maksimum 62,9 ppb) belirlenmiştir (121). 2003-2004 yıllarında Ege Bölgesi'nin 7 farklı bölgesinden toplanan 115 incir örneğinin ise 55 tanesinde (%47,2) 0,12-15,31 μg/kg düzeyinde OTA teşhis edilmiştir. Sadece 4 örnekte 1 μg/kg'ın üstünde toksin belirlenmiştir (122).

Benzer şekilde, 1996-1997 yılları arasında İngiltere'ye ihraç edilen kuru üzümlerde de yüksek düzeyde OTA tespit edilmesi ve ihracatta büyük sorunlar yaşanması üzerine üzüm ve üzüm ürünlerinde toksin aranmasına yönelik çalışmalar başlamıştır.

Türkiye'de 1997 yılında yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde (27) mikotoksinlerden sadece aflatoksinler, patulin ve ergot alkaloidleri için limit değerlere yer verilirken, 2002 yayımlanan "Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Belirlenmesi Hakkında Tebliğ" ile üç üründe OTA için maksimum seviye bildirilmiştir (28). 26879 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan 17/05/2008 tarihli 2008/26 numaralı tebliğ ile de gıda maddelerindeki OTA'nın maksimum limitleri yeniden belirlenmiştir. Tablo 2-5'de Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenen yeni limitler görülmektedir (29).

2.4. Üzüm ve Üzüm Ürünleri:

Türkiye gerek coğrafi ve gerekse ekolojik özellikleri itibariyle bağcılığa çok elverişlidir. Ülkemiz asmanın anavatanı olması ve bağcılık tarımının hayli eskiye dayanması yanında, gerek üretim miktarı ve gerekse çeşit zenginliği bakımından dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer almaktadır (123, 124). Türkiye yaklaşık 525 bin

hektar bağ alanında, yılda 3.5 milyon ton civarında üzüm üretimi gerçekleştirilmektedir. Üretilen üzümlerin yaklaşık %30'u sofralık, %37'si kurutmalık, %30'u pekmez, pestil, sucuk, şıra ve %3'ü şaraplık olarak değerlendirilmektedir. Dünyanın altıncı büyük üzüm üreticisi olan ülkemizde üretilen üzümün yaklaşık %63'ü çekirdekli, %27'si ise çekirdeksiz üzümden oluşmaktadır.

Üzüm ülkemizde; taze olarak, kurutularak, pekmez, pestil gibi yöresel ürünlere işlenerek, üzüm suyu, üzüm suyu konsantresi ve şarap yapılarak ve bunun yanında, sirke ve rakı yapımında kullanılarak tüketilmekte ise de en çok kurutularak ve pekmez yapılarak değerlendirilmektedir.

Kuru üzüm, yüksek şeker içeriğinden dolayı, kalori değeri yüksek bir besin maddesidir. Ayrıca mineral maddelerden kalsiyum, potasyum, sodyum ve demir yönünden zengin olduğu gibi bazı vitaminler (A, B1, B2, Niasin ve C vitaminleri) yönünden de önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Bazı karaciğer hastalıkları ile kansızlığın tedavisinde etkili olan üzüm, hipertansiyonu da kontrol altında tutmaktadır. Ayrıca içerdiği meyve asitleri ve lifli yapısı ile mideye zarar vermeden böbrek ve bağırsak sisteminin çalışmasını düzenler, kanın temizlenmesine yardımcı olur. Diğer yandan, yüksek kalori içeriğine karşın, çok düşük miktarlarda yağ ve protein içerdiğinden ideal bir diyet besinidir (125, 126).

Üzümlerde kurutma işlemi doğal olarak ve bandırma yapılarak iki şekilde olmaktadır. Doğal kurutma yöntemi genellikle siyah renkli çekirdekli üzüm çeşitlerinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde hasadı yapılan üzümler bağda bol güneş gören yerlere toprak üzerine serilmekte veya salkımlar ipe dizilerek bağdaki çardaklarda veya sundurma altlarında gölgede kurutulmaktadır.

Gerek çekirdekli ve gerekse çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin kurutulmasında kullanılan bandırma yönteminde amaç üzüm tanesi üzerindeki mumsu pus tabakasının uzaklaştırılıp ve bir miktar çatlama sağlayarak da tanenin su kaybını hızlandırmak suretiyle kurumanın çabuklaştırılması ve iyi bir renk elde edilmesidir. Bandırma sıvısı olarak potasa denilen potasyum karbonat ile buna zeytinyağı ilave edilmiş şekli, bazen de küllü su-zeytinyağı karışımı kullanılmaktadır. Bandırma işlemine tabi tutulan üzümler toprak, kağıt, beton veya tel sergi yerlerinde kurutulmaktadır (128).

Tablo 2-4: Türk Gıda Kodeksi'nde yer alan OTA limitleri

Gıda Maddesi	**Maksimum limit (µg/kg) (ppb)**
OTA	
İşlenmemiş tahıllar	5,0
Tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan tüketime sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3,0
Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm dahil)	10,0
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,0
Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve	10,0
Şarap (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az % 15 olan şaraplar hariç) ve meyve şarapları	2,0
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli	2,0
Üzüm suyu, üzüm suyu konsantresi, üzüm nektarı ile doğrudan tüketime sunulan üzüm şırası ve üzüm şırası konsantresi	2,0
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,5
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,5
Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	10,0

Ülkemize özgü geleneksel ürünlerimizden biri de; içerdiği mineraller yanında iyi bir enerji kaynağı olması nedeniyle son derece besleyici bir ürün olan pekmezdir. Üzüm pekmezi, taze ve kuru üzüm şırasının asitliğini gidermeden veya giderdikten sonra vakum altında veya açıkta koyulaştırılması ile elde edilen koyu kıvamlı bir üründür (129). Üzüm pekmezi, hemen hemen yurdumuzun her yerinde üretilmekle birlikte kırsal bölgelerde daha yaygın olup çok eski geçmişe sahiptir.

Kırsal kesimde geleneksel yöntemle yapılan pekmez üretiminde hasat edilen üzümlere, kalıntılardan uzaklaştırılmak amacıyla yıkanıp, sıkılarak şırası çıkarıldıktan sonra, asitliği gidermek amacıyla %50-90 oranında kireç içeren beyaz renkli bir toprak türü olan pekmez toprağı ilave edilir. Daha sonra şıranın koyulaştırılması amacıyla kaynatma işlemi gerçekleştirilir. Koyulaştırma işlemi, güneşi bol ve kurak bölgelerde güneş enerjisinden yararlanılarak da yapılır. Modern yöntemle sıvı pekmez üretiminde ise kıyılmış kuru üzümlere katı- sıvı ekstraksiyonu uygulanarak özütleme işlemi yapılır. Temizlenen üzümler değirmenden geçirilip preslenerek üzüm şırası elde edilir. Üzüm

şırasına asitliği gidermek amacıyla pekmez toprağı ya da kalsiyum karbonat ilave edilir. Üzüm şırasının tamamen berraklaşması için tanen- jelatin uygulaması veya enzimatik yolla durultma işlemi yapılır. Berrak şıra açık kazan ya da vakumla suyu buharlaştırarak koyulaştırılır.

Üzümler, hasat öncesi, hasat sırasında veya üzümlerin işlenmesi aşamasında çeşitli küf türleri tarafından kontamine olabilmektedir. Meyveler olgunlaşma aşamasında, dokularda pH'nın yükselmeye başlaması, koruyucu tabakanın yumuşaması ve meyvenin savunma mekanizmasının zayıflamasıyla birlikte fungal saldırıya karşı hassas hale gelmektedirler.

Üzümlerin özellikle *Penicillium, Aspergillus, Mucor, Rhizopus, Cladosporium, Alternaria, Uncinula, Botrytis* ve *Plasmopara* cinsi küfler tarafından saldırıya uğradığı belirtilmektedir. 1996 yılına kadar, üzüm mikotoksinsiz güvenilir bir meyve olarak düşünülürken İsviçre'de yapılan bir çalışmada farklı coğrafik kökenli şarap örneklerinde OTA'nın saptanması bu görüşü değiştirmiştir (130).

Ülkemizde ilk kez, 1996-1997 yılları arasında İngiltere'ye ihraç edilen kuru üzümlerde yüksek düzeyde OTA tespit edilmesi ve ihracatta büyük sorunlar yaşanması üzerine üzüm ve üzüm ürünlerinde toksin aranmasına yönelik çalışmalar başlamıştır. Kuru üzümlerde OTA'nın hangi aşamada meydana geldiğini tespit etmek amacıyla Eltem ve ark. (131) 1998-2001 yılları arasında Ege Bölgesinde seçilen bağlarda toprak, ben düşme ve hasat öncesi dönemlerdeki yaş üzümler ile kuru üzümlerde potansiyel OTA üreticisi küfleri ve toksin üretme yeteneklerinin belirlemişler ve OTA üretiminin üzümün gelişme dönemi boyunca bağlarda olgunlaşma dönemi ile başladığını ortaya koymuşlardır. Topladıkları 203 örneğin 82'sinde OTA tespit edilmiş ve düzeyin ağırlıklı olarak 10-50 ppb arasında olduğu belirtilmiştir.

1998-2006 yılları arasında farklı araştırmacılar tarafından ülkemizde değişik bağlardan elde edilen kuru üzüm örneklerinde yapılan araştırmalarda 0,26-34,84 μg/kg arasında değişen düzeylerde OTA'ya rastlanmıştır (132-135). Aksoy ve ark. (136) tarafından incelenen 1885 sultani kuru üzüm örneğinden sadece 172 örnekte OTA'ya rastlanmamıştır. Adana'da 2 farklı yerden temin edilen sultani üzüm örneklerinin 13'ünde 10 μg/kg limitin üzerinde OTA tespit edilmiştir.

Son yıllarda, özellikle üzüm, üzüm suyu ve şaraptaki OTA düzeylerinin araştırılması ile ilgili çalışmalardaki artış dikkat çekmektedir. İsviçre'de şarap ve üzüm sularında yapılan OTA taranmasında şarap örneklerinde 3-451 pg/mL, kırmızı üzüm sularında ise 3-311 pg/mL arasında değişen miktarlarda OTA'ya rastlanmıştır. Üzüm suyunda rapor edilen en yüksek OTA değeri 6270 ng/L'dir. Kırmızı üzümlerden üretilen üzüm sularında diğer üzüm sularına kıyasla daha yüksek düzeyde OTA bulunmuştur (137). Araştırmacılar şaraplardaki seviyenin bir risk oluşturmayacağını ancak kırmızı üzüm sularındaki seviyenin yeni doğanlar ve çocuklar açısından riskli olabileceğini ve bu seviyenin 100 pg/mL'nin altında tutulması gerektiğine dikkati çekmişlerdir.

Ülkemiz İspanya ve İtalya'dan sonra en fazla şarap üretilen ülkelerin başında gelmektedir. Ancak Türk şaraplarında OTA düzeyi ile ilgili yayımlanmış sadece bir çalışmaya rastlanmıştır. Farklı üretici firmalara ait 47 şarap örneğinde 0,053-1,372 g/L düzeyinde OTA saptanmıştır. Trakya ve Ege Bölgesi kırmızı şaraplarında diğer bölgelere kıyasla OTA düzeyi yüksektir (138).

Arıcı ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada OTA içeren üzümlerin pekmeze işlenmesi durumunda pekmezdeki OTA miktarının üzümlere göre 5-6 kat arttığı belirlenmiştir. Yine bu çalışmada pekmez üretim aşamasındaki nem oranının, pH'nın, toplam şeker miktarının pekmezdeki OTA miktarını etkilediği belirtilmiştir (139).

Üzüm ve üzüm ürünlerinde OTA oluşturan küflerin ana kaynağı topraktır. Bu nedenle üzümlerde OTA oluşumunun engellenmesi için öncelikle topraktaki fungusların üzüme bulaşmasını engelleyecek tedbirler alınmalıdır (140, 141).

1. Bağ tesisinde öncelikle telli destek sistemli modern bir bağ oluşturmalı ve üzümlerin toprakla teması önlenmelidir.

2. Kış budamasında aşırı çubuk bırakılmamalı, yaz budamaları da düzenli olarak yapılarak salkım çevresinde hava sirkülasyonu sağlanmalıdır.

3. Damla sulama sistemleri gibi toprak yüzeyini az ıslatan sulama sistemleri tercih edilmelidir. Geç dönemde ve aşırı sulamalardan kaçınmalıdır.

4. Olgunlaşma döneminde toprak işleme yapılmamalıdır.

5. Kurutmalık üzümlerde aşırı hormon uygulamalarından kaçınılmalıdır.

6. Hastalık ve zararlılara karşı ilaçlama uygulamaları zamanında ve uzman tavsiyesine göre yapılmalıdır.

7. Hasat ve kurutma işlemi sırasında çürük, küflü üzüm salkımları sağlıklı salkımlardan ayrılmalı ve birlikte kurutulmamalıdır.

8. Kuru üzümler uygun depo koşullarında (%60-65 nem, 5-10°C) serin ve kuru ortamlarda depolanmalıdırlar.

9. Üzüm mutlaka iyi kurutulmuş olarak sergiden kaldırılmalıdır. (Nem oranı %13 ve altında olmalıdır).

10. Üzüm toprak sergi alanlarına serilmemelidir.

2.5. OTA Tayininde Kullanılan Yöntemler

Gıdalarda OTA analizinde tercih edilen yöntemler immunokimyasal yöntem (ELISA) ile ince tabaka kromotografisi (TLC) ve fluoresans dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleridir. OTA asitlendirilmiş ortamlardan organik çözücülerle kolaylıkla ekstre edilebilmektedir. Yöntemlerin tümünde OTA analizine geçmeden önce örnekte, uygun yöntemlerle ekstraksiyon, saflaştırma ve zenginleştirme işlemlerinin yapılması gerekmektedir.

2.5.1. İmmunokimyasal Yöntem

Antijen-antikor reaksiyonuna dayanan enzim bağlanmış immunosorbant 'Enzyme-linked immunosorbent assay' (ELİSA) yönteminde esas katı yüzeyler üzerine bağlanmış az miktarda antikor ile örnekteki OTA ve OTA ile işaretlenmiş enzim (horseradish peroksidaz) arasındaki reaksiyonlardır. Antikor ile örnek ve OTA ile işaretlenmiş enzimin inkübasyonunun ardından yapılan yıkama sonrası bağlanmamış enzim uygun bir substrat ile reaksiyona sokulur ve oluşan rengin şiddetinden OTA miktarının hesaplanmasına geçilir. ELİSA yönteminin basit olması, kısa sürede çok sayıda analiz yapılabilmesi, fazla solventle çalışılmaması gibi avantajları bulunmaktadır. Buna karşın, mikotoksinlerin ürüne homojen bir şekilde yayılmamasından dolayı, ELİSA yönteminde az miktarda örnek kullanılması en önemli sorunu oluşturmaktadır.

Üzüm ve üzüm ürünlerinde OTA varlığı saptanmasında ELİSA yöntemi bazı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (137-139).

2.5.2.İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi yöntemi (TLC), OTA'nın kalitatif ve kantitatif tayini için eskiden beri kullanılmaktadır. AOAC (Association of Analytical Communities)'nin yönteminde OTA, örneklerden asit ortamda kloroform ile ekstre edilmekte, alkali emdirilmiş diatome toprağı sütunlarda temizlendikten sonra ince tabaka kromatografisi işleminin ardından UV lamba altında 360 nm'de floresans gösteren lekeler şeklinde teşhis ve tayin edilmektedir. Yöntemin hassasiyeti ince tabakanın amonyak buharlarına tutulması ile arttırılabilmektedir. Ostry ve ark. TLC yöntemini kullanarak kuru üzümlerde OTA varlığını araştırmışlardır (142).

2.5.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Fluorasans dedektörlü ters faz HPLC, OTA analizinde en fazla tercih edilen analiz yöntemidir. OTA doğal fluoresans gösteren bir maddedir. Bu özelliği nedeni ile; herhangi bir türevlendirme işlemine gerek olmadan çok düşük OTA seviyelerini fluoresans dedektörle tayin etmek mümkün olabilmektedir. HPLC ile analizlerde C_{18} kolonlar ve asetik asitli asetonitril su karışımı mobil fazlar tercih edilmektedir.

OTA'nın gıda maddeleri ve biyolojik ürünlerdeki düzeylerinin tayininde en önemli safha ekstrelerin temizlenmesidir. OTA'nın örneklerden su ve asetonitril/metanol karışımları veya kloroform ile ekstraksiyonunun ardından yapılacak temizleme işleminde en fazla tercih edilen yöntem, çözücü sarfiyatının düşük düzeyde olduğu katı faz ekstraksiyon tekniğidir. Çok daha hızlı ve etkili temizlemenin sağlanan bu yöntemde katı faz olarak florisil, C_{18}, silikajel ve diatome toprağı kullanılmaktadır (143-149).

İmmünoafinite kolon kromatografisi uluslararası bilim çevrelerince kabul görmüş en iyi OTA saflaştırma yöntemidir. İmmünoafinite kolonun özelliği, OTA'ya özel bir monoklonal antikor içermesidir. Örneğe ait ekstre immünoafinite kolondan geçerken OTA antikorlar tarafından tutulur, daha sonra kolondan geçirilen elüsyon çözeltisi antikoru denatüre eder, OTA saf halde elüsyon çözücüsüne geçer ve elüat HPLC ile analiz edilir (11, 15, 16).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada İstanbul'un değişik semtlerindeki pazar ve marketlerden temin edilen 50 markasız kuru üzüm (500 g), 20 markalı ve 5 markasız üzüm pekmezi ile 10 markalı üzüm suyu örnekleri kullanıldı. Örnekler, ekstraksiyonları yapılana kadar buzdolabında ($+4^0$C) muhafaza edildi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

OTA standardı	Supelco 46912
Etanol	Riedel-de Häen, 32221
Metanol	Riedel-de Häen, 34860
Asetonitril	Riedel-de Häen, 34888
Saf su (Milli Q)	Milli-Q, Millipore cihazı
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	
Asetik asit	Merck, 1.00056.2500
Bor triflorürün metanoldeki	Sigma B1252
%14'lük çözeltisi	

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Ayarlanabilir otomatik pipetler	Eppendorf
Santrifüj aleti	Hettich Universal 32R
Hassas terazi	Precisa XB 220A
Laboratuar blenderi	Waring commercial
Girdap karıştırıcı	Vm20 Vortex, Biobac

Vakum pompası	Speedivac ES 35
Vakum manifold cihazı	Varian
Siyah bantlı filtre kağıdı 110 mm	Schleicher& Schüll 300 010
Mobil faz filtrasyon sistemi	Phenomenex
İmmunoaffinite kolon	Ochratest^{TM} Vicam 13012
pH metre	pH 211, Hanna
Milli Q su cihazı	Millipore
Ultrasonik banyo	Transsonic 460 H
Blok ısıtıcı	Lab-line
Azot tüpü	Habaş
Su banyosu	Memmert

Çalışmada ayrıca çeşitli hacimlerde vialler, enjektörler, cam pipetler, mavi/sarı pipet uçları ve diğer cam laboratuvar aletleri kullanıldı.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC):

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	LC-Solution
Bilgisayar ve yazıcı	HP L1706 ve Xerox
HPLC kolonu C_{18}, (15cm × 0,46) 5µm	Teknokroma Mediterranea sea 18

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1.Mobil Faz Çözeltisi

Milli Q su 2 µm'lik membran filtreden süzüldükten sonra asetonitril ve su ultrasonik su banyosunda degaze edildi. Daha sonra 99:99:2 (su:asetonitril:asetik asit) oranında mobilfaz HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlandı.

3.3.2.Fosfat Tamponu

8 g NaCl, 1,2 g Na_2HPO_4, 0,2 g KH_2PO_4, 0,2 g KCl 990 mL bidistile suda çözülerek %37'lik HCl ile pH 7'e ayarlandı ve Milli Q su ile hacmi 1L'ye tamamlandı.

3.3.3.Okratoksin A Standart Çözeltileri

3.3.3.1.Standart Çözelti

Sertifikalı OTA standart çözeltisi (benzen:asetik asit (99:1) karışımı içerisinde 50 ng/µL konsantrasyonundaki) kullanıldı. Ampul içerisinde sıvı formda temin edilmiş olan OTA çözeltisi analizde kullanılıncaya kadar -20^{0}C'de muhafaza edildi.

3.3.3.2.Ara Stok Çözeltileri

50 ng/µL konsantrasyondaki OTA standart çözeltisinin 20 µL'si 980 µL etanol ile seyreltilerek 1 ng/µL konsantrasyonda ara stok çözeltisi hazırlandı.

1 ng/µL konsantrasyonundaki ara stok çözeltisinden 100 µL alınıp, 900 µL etanol ile seyreltilerek 0,1 ng/µL konsantrasyonda ikinci bir ara stok çözeltisi hazırlandı.

3.3.3.3.Çalışma Çözeltileri

Ara stok çözeltilerinin metanol ile seyreltilmesi ile 0,5-40 ng/mL aralığında değişen konsantrasyonlardaki çalışma çözeltileri hazırlandı. Çalışma çözeltileri analiz amacıyla alete verilmeden önce yarı yarıya su ile seyreltildi.

OTA çalışma çözeltileri -20^{0}C'de cam vial içerisinde muhafaza edildi, analizde kullanılmadan önce sıcaklığının oda koşullarına gelmesi sağlandı.

3.4. Yöntem

Örneklerin analizi Avrupa Birliği'nin 2002 Eksperler raporunda yer alan valide edilmiş yönteme göre yapıldı (150). Yöntemin esası, ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinin ardından fluoresans dedektörlü ters faz HPLC ile analizidir.

3.4.1.Okratoksin A'nın HPLC ile Tayin Yönteminin Validasyonu

Örneklerdeki OTA miktarlarının tayinine geçmeden önce OTA standartı ile çalışılarak yöntemin validasyonu yapılmıştır. Kromatografik çalışma koşulları Tablo 3-1'de gösterilmektedir.

Tablo 3-1: HPLC aletinin kromatografik çalışma koşulları

Kolon	C_{18} (15 cm × 0,46) 5µm
Mobil faz	su:asetonitril:asetik asit (99:99:2, v:v:v), izokratik sistem
Akış hızı	1 mL/dak
Enjeksiyon hacmi	100 µL
Basınç	Minumun 0 bar, maksimum 200 bar
Deteksiyon	Eksitasyon dalga boyu: 333 nm, Emisyon dalga boyu: 460 nm
Alıkonma zamanı	11-12 dakika

3.4.1.1.Doğrusallık

OTA standart çözeltilerine karşı dedektörün cevabının belli konsantrasyon aralığındaki doğrusallığını belirlemek amacıyla 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10 ve 20 ng/mL'lik çözeltilerden 4'er adet hazırlandı. Her çözeltiden 3'er kez enjekte edildi. Kromatogramlarda standartlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak y=ax+b formülüne göre bir kalibrasyon eğrisi çizildi.

3.4.1.2.Doğruluk ve Kesinlik

Gün içi tekrarlanabilirlik

Yüksek, orta ve düşük konsantrasyonları temsil eden 2; 5; 20 ng/mL konsantrasyonlardaki OTA standart çözeltilerinden 4'er adet hazırlandı ve gün içinde her birinden 3'er kez enjekte edildi. Elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarının ortalaması alındı ve değişim katsayıları hesaplandı.

Günler arası tekrarlanabilirlik

Yüksek, orta ve düşük konsantrasyonları temsil eden 2; 5 ve 20 ng/mL konsantrasyonlardaki OTA standart çözeltilerinden 1'er adet hazırlandı ve her birinden 3'er kez enjekte edildi. Bu işlem birbirini takip eden 3 gün boyunca ve her defasında

yeni çözeltilerle çalışılmak koşuluyla tekrarlandı. Elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarının ortalaması alındı ve değişim katsayıları hesaplandı.

3.4.2.Örneklerin Hazırlanması

3.4.2.1.Ekstraksiyon

Örneklerin hazırlanmasında immunoaffinite kolonlarının temin edildiği firmanın çalışma koşullarına uyuldu. 50 g örnek, 30 mL saf su eklenerek Waring blenderda 1 dakika süre ile yüksek devirde homojenize edildi. Homojen karışıma 140 mL metanol ve 30 mL su ilave edilerek yeniden 1 dakika süre ile karıştırıldı. Örnek ekstresi siyah bantlı süzgeç kağıdından 50 mL'lik falkon tüpe süzüldükten sonra, süzüntünün 10 mL'si %0,01 Tween 20 içeren 40 mL fosfat tamponu ile seyreltilerek 3000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Süzüntünün seyreltilmesinin temel nedeni, ekstrenin yüksek organik çözücü içeriğine immunoaffinite kolonların dayanıklı olmayışıdır.

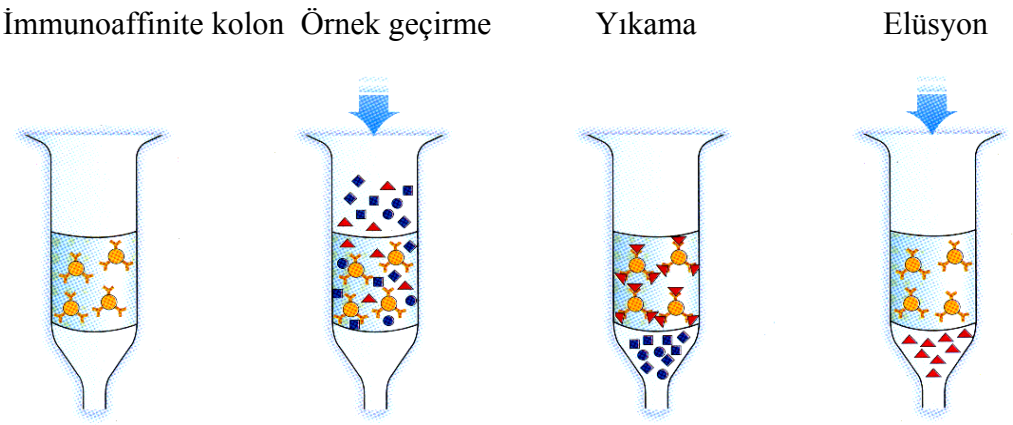
3.4.2.2.Temizleme ve Zenginleştirme

Ekstrenin saflaştırılmasında OTA'ya özel spesifik antikorlar içeren Ochratest^{TM} Vicam marka immunoaffinite kolonlar kullanıldı. Kolonlar 30^0C'yi geçmeyen oda sıcaklığında muhafaza edildi. Antikorların OTA molekülünü tutabilmelerini sağlamak için, 20 mL ekstre, 1 damla/saniye hızla kolondan geçirildi. Ekstre kolondan geçirildikten sonra, kolon derhal 10 mL %0,01 oranında Tween 20 içeren fosfat tamponu ve 10 mL su ile yıkandı. Elüsyondan önce kolondan tüm suyun çıktığına emin olmak için 10-20 mL kadar hava kolondan geçirildi. Spesifik antikorlara bağlı halde bulunan OTA kolondan, 1 damla/saniye hızla ve 1,5 mL metanol:asetik asit (98:2) kullanılarak elüe edildi, 1,5 mL su ilave edilip vortekste karıştırıldıktan sonra HPLC'ye uygulandı. Şekil 3-1' de immunoaffinite kolon ile temizleme işlemi gösterilmektedir. Şekil 3-2' de üzüm ve üzüm ürünlerinin ekstraksiyon aşaması verilmiştir.

3.4.2.3.Geri Kazanım Çalışmaları

Örneklerden geri kazanım oranlarının belirlenmesi için, yapılan analiz sonucu OTA içermediği tespit edilen pekmez örneklerine OTA standart çözeltisinden örnekteki miktarı 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 ppb olacak şekilde 7 ayrı seviyede katım yapıldı. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip, karıştırıcıda 1-2 dakika karıştırıldıktan sonra, 3.4.2.1'de belirtilen koşullarda çalışmaya devam edildi. Her konsantrasyon için 4 kez çalışıldı. Katım yapılmamış boş pekmez örneğiyle paralel çalışılarak matriksten ileri

gelebilecek piklerin varlığı kontrol edildi. Kromatogramlarda standartlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak y=ax+b formülüne göre bir kalibrasyon eğrisi çizildi, geri kazanım oranları ve değişim katsayıları hesaplandı. Teşhis sınırının belirlenmesinde sinyal/gürültü oranı 3:1 olarak kabul edildi. Kalibrasyon eğrisinde en düşük konsantrasyon değeri ise tayin sınırı olarak kabul edildi.



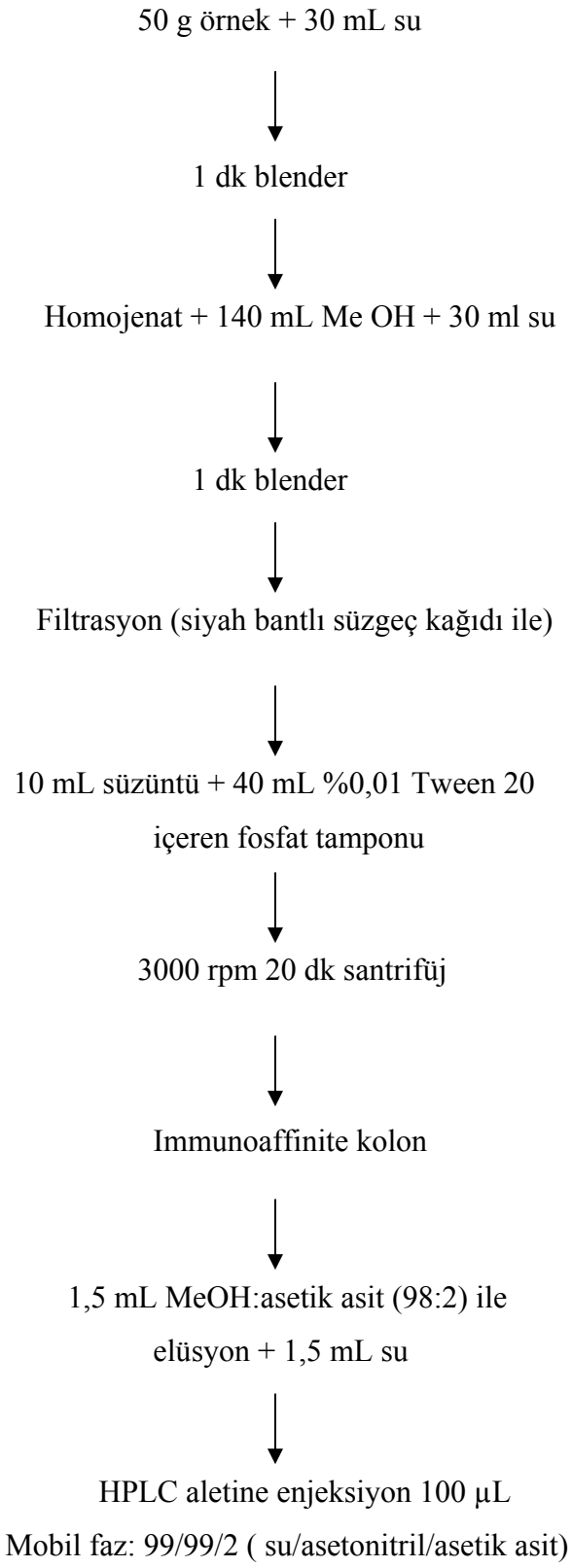
Şekil 3-1: İmmunoaffinite kolonda temizleme işlemi

3.4.2.4.Konfirmasyon

OTA'nın konfirmasyonu metil esterine dönüştürülerek gerçekleştirildi. 0,4 mL ekstre ve 0,4 mL OTA standardı kuruluğa kadar uçurularak, üzerlerine 0,5 mL bor triflorürün metanoldeki %14'lük çözeltisinden ilave edildi. Karışım 15 dakika 50-60^{0}C de su banyosunda ısıtıldı. Soğuduktan sonra azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu. Artık daha sonra 0,4 mL mobil fazda çözülerek, vortekste karıştırıldı. Türevlendirilmiş ekstre ve standart HPLC aletinde aynı çalışma koşullarda analiz edildi. OTA-metil esterinin alıkonma zamanının OTA pikinden 23 dakika sonra olduğu tespit edildi (151).

3.4.3.Örneklerin Analizi

İstanbul'daki çeşitli pazar ve marketlerden temin edilen 50 kuru üzüm, 25 üzüm pekmezi ve 10 üzüm suyu örneği, 3.4.2.1; 3.4.2.2'de anlatıldığı şekilde ekstre edildi ve fluoresans dedektörlü HPLC ile OTA'nın kantitatif tayini yapıldı. OTA tespit edilen örneklerde 3.4.2.4'de anlatıldığı şekilde konfirmasyon yapıldı. Her örnek iki kez çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Türk Gıda Kodeksi'nde kabul edilen maksimum OTA limitlerine göre değerlendirildi.



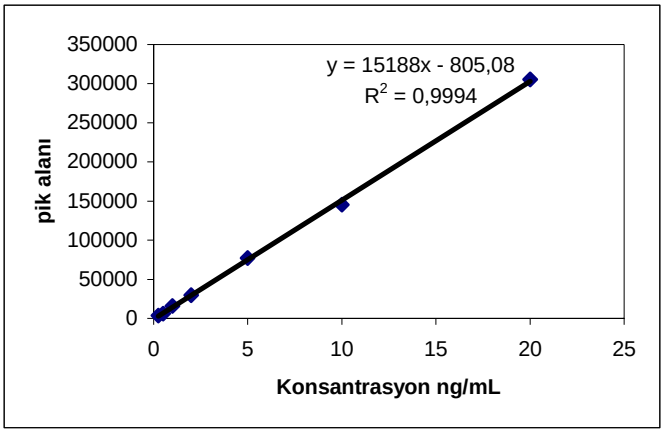
Şekil 3-2: Üzüm ürünlerinin ekstraksiyon aşaması

4.BULGULAR

4.1. Validasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.1.1.Doğrusallık

3.4.1.1'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen OTA kalibrasyon eğrisi Şekil 4-1'de ve bu eğrinin hazırlanmasında kullanılan ortalama pik alanları ve değişim katsayıları (CV) ise Tablo 4-1'de gösterilmektedir.



Şekil 4-1: OTA kalibrasyon eğrisi (Standart çözeltiler)

Tablo 4-1: OTA kalibrasyon eğrisine ait ortalama pik alanları ve CV değerleri

Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama Pik alanı	CV (%)
0,25	3856	8,6
0,5	7192	13,3
1	15126	4,4
2	29867	2,5
5	75316	2,5
10	147131	3,6
20	302770	1,2

4.1.2.Doğruluk ve Kesinlik

4.1.2.1.Gün İçi Tekrarlanabilirlik

3.4.1.2'de anlatıldığı şekilde çalışılarak 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltilerden elde edilen pik alanları ve CV değerleri Tablo 4-2'de gösterilmektedir.

Tablo 4-2: Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları

Örnek No.	2 ng/mL	5 ng/mL	20 ng/mL
1	29792	77132	306718
2	29280	72945	306496
3	29430	74497	301059
4	30969	76692	306475
Ortalama alan	29867	75316	305187
CV (%)	2,5	2,5	0,9

4.1.2.2.Günler Arası Tekrarlanabilirlik

3.4.1.2'de anlatıldığı şekilde çalışılarak 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltilerden elde edilen pik alanları ve CV değerleri Tablo 4-3'de gösterilmektedir.

Tablo 4-3: Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları

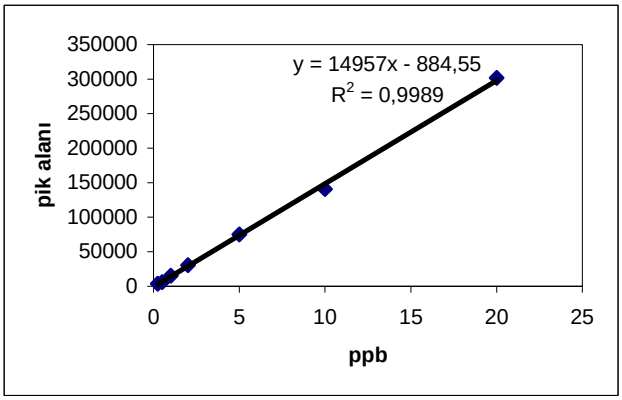
Örnek No.	2 ng/mL	5 ng/mL	20 ng/mL
1. gün ortalama	29500	74858	304757
2. gün ortalama	30115	82893	304002
3. gün ortalama	33002	81918	357188
Ortalama alan	30872	79889	321982
. CV	6,0	5,4	9,4

4.2. Geri Kazanım Çalışmaları

3.4.2.3.de anlatıldığı şekilde yapılan katım deneyleri sonucunda tayin edilebilir minimum OTA konsantrasyonu (LOQ) 0,25 ng/mL, teşhis edilebilir minimum OTA konsantrasyonu (LOD) 0,10 ng/mL olarak belirlendi. Bu denemeler sonucunda elde edilen geri kazanım değerleri ve değişim katsayıları Tablo 4-4'de, bu değerlerle hazırlanan kalibrasyon eğrisi ise Şekil 4-2'de gösterilmektedir.

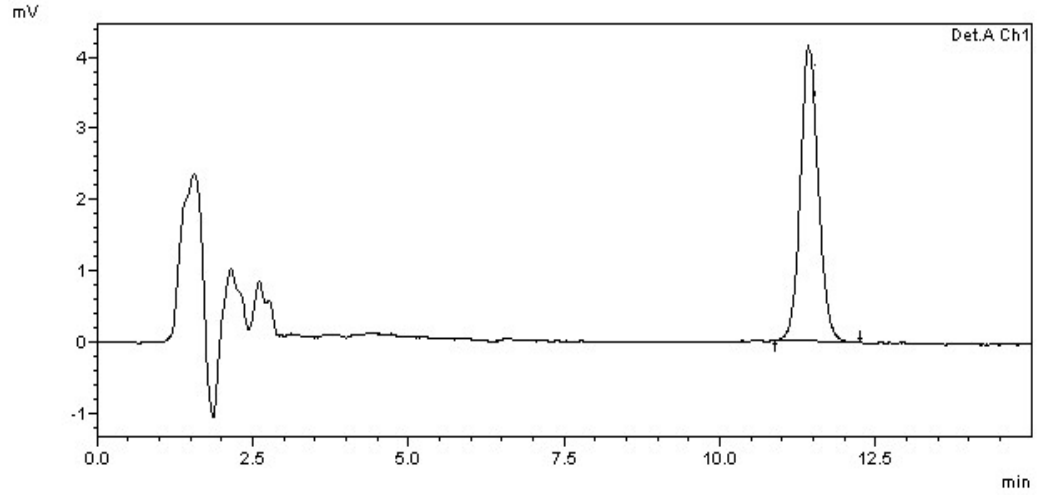
Tablo 4-4: Ortalama geri kazanım değerleri ve değişim katsayıları

Katım ppb	% Geri Kazanım	CV (%)
0,25	98,5	8,96
0,5	97,8	12,7
1	101,5	4,9
2	101,6	4,6
5	101,7	4,8
10	101,6	4,2
20	101,7	3,4

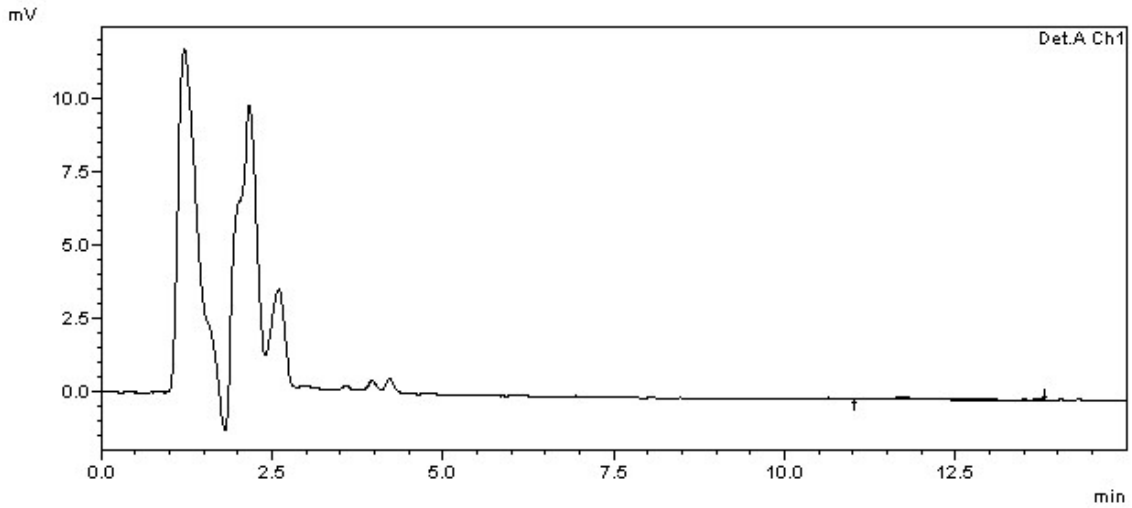


Şekil 4-2: OTA kalibrasyon eğrisi (geri kazanım çalışmaları)

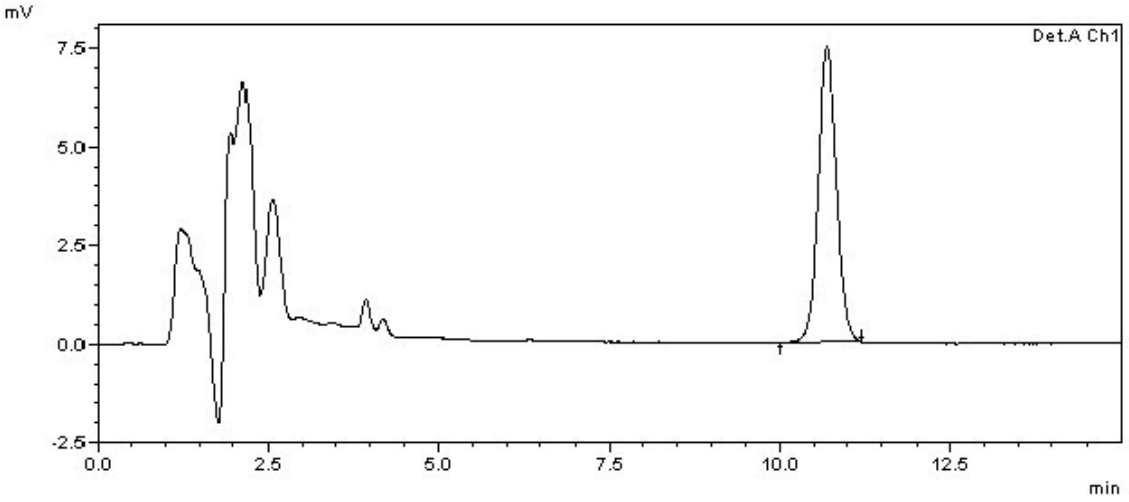
Şekil 4-3'de OTA standartının, Şekil 4-4'de OTA tespit edilmeyen pekmez örneğinin, Şekil 4-5'de 10 ppb düzeyde OTA katılmış pekmez örneğinin HPLC kromatogramları gösterilmiştir.



Şekil 4-3: OTA standartına ait kromatogram (5 ng/mL)



Şekil 4-4: OTA tespit edilmeyen pekmez örneğinin kromatogramı

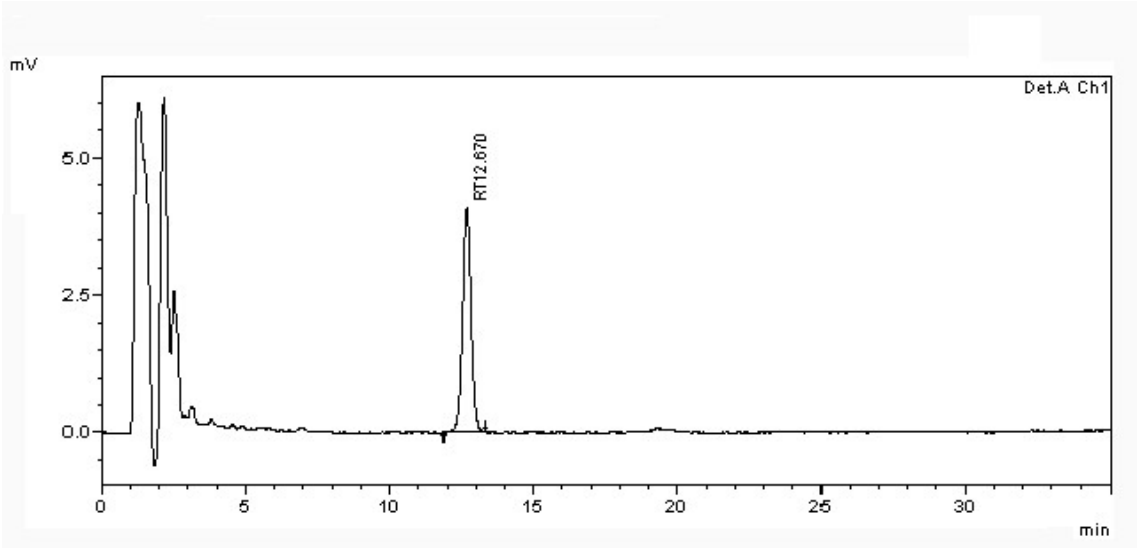


Şekil 4-5: 10 ppb katım yapılmış pekmez örneğinin kromatogramı

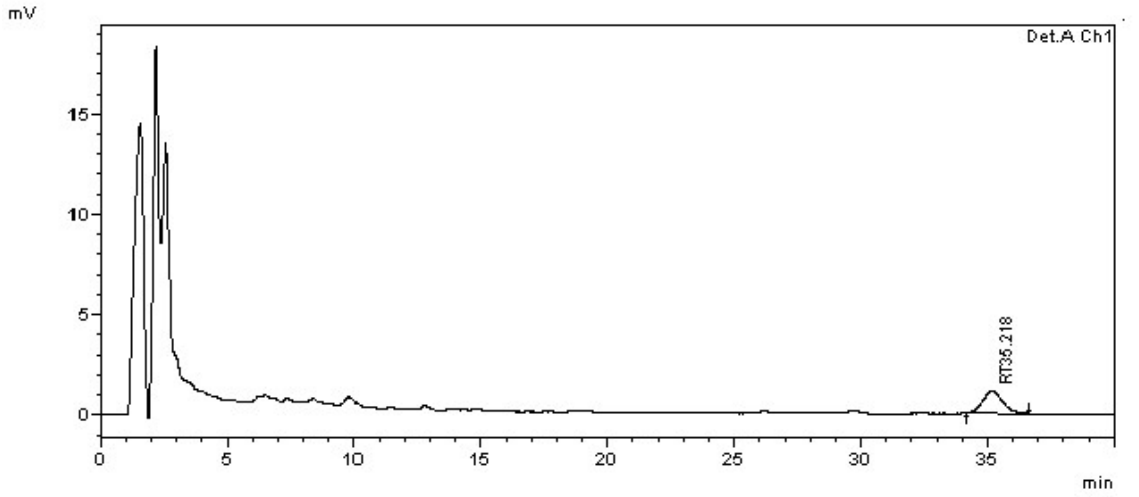
4.3. Konfirmasyon

3.4.2.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan OTA standartına ve OTA-metil esterine ait kromatogramlar Şekil 4-6 de gösterilmektedir.

a)



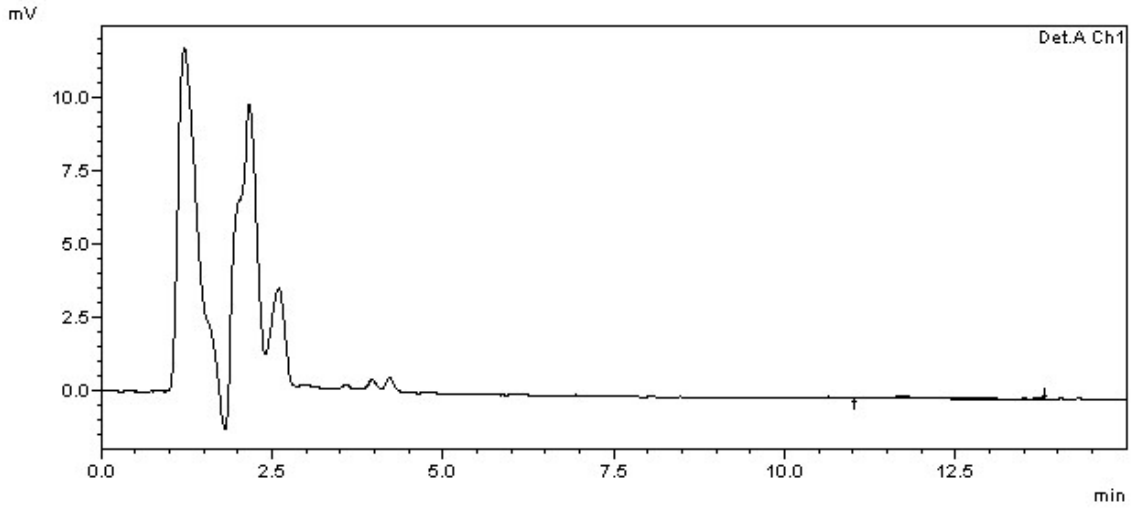
b)



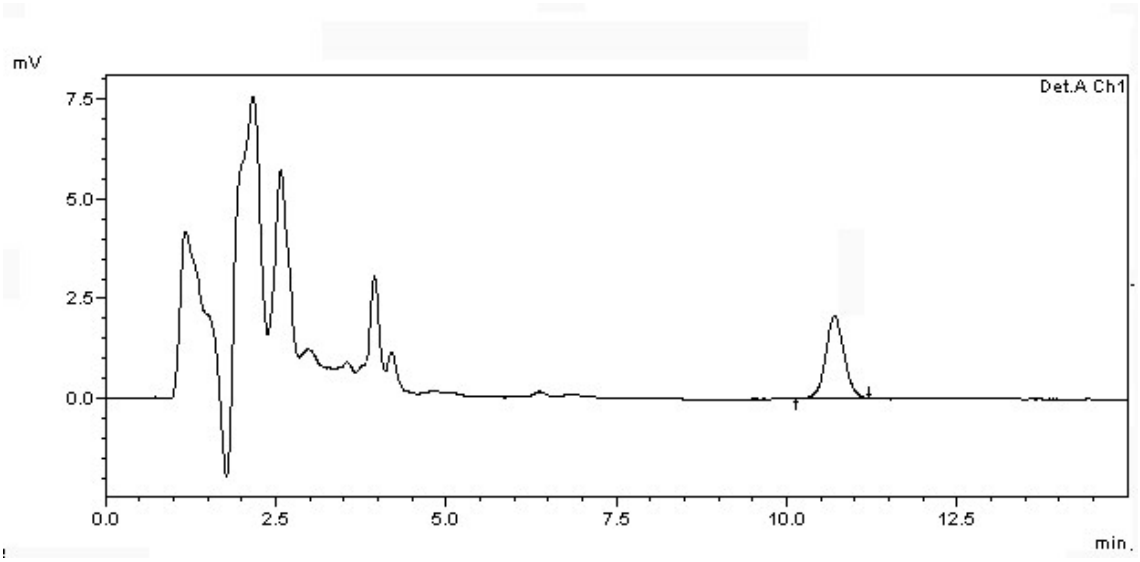
Şekil 4-6: OTA standartına (a) ve OTA-metil esterine (b) ait kromatogramlar

4.4. Örneklerin Analizine Ait Sonuçlar

3.4.2 ve 3.4.3'de anlatıldığı şekilde analizleri yapılan kuru üzüm ait sonuçlar Tablo 4-5'de, OTA tespit edilmemiş kuru üzüm örneğine ait kromatogram Şekil 4-7'de, OTA tespit edilmiş kuru üzüm örneğine ait kromatogram Şekil 4-8'de gösterilmektedir.



Şekil 4-7: OTA tespit edilmemiş kuru üzüm örneğine ait kromatogram



Şekil 4-8: 2,59 ppb OTA tespit edilmiş kuru üzüm örneğine ait kromatogram

Tablo 4-5: Kuru üzüm örneklerindeki OTA düzeyleri

Örnek No.	OTA düzeyi (ppb)	Örnek No.	OTA düzeyi (ppb)	Örnek No.	OTA düzeyi (ppb)	Örnek No.	OTA düzeyi (ppb)
1	t.e	14	t.e	27	t.e	40	t.e
2	t.e	15	t.e	28	t.e	41	t.e
3	t.e	16	t.e	29	t.e	42	**<LOQ**
4	t.e	17	t.e	30	t.e	43	t.e
5	t.e	18	t.e	31	t.e	44	t.e
6	t.e	19	t.e	32	t.e	45	t.e
7	t.e	20	t.e	33	**2,59**	46	**1,07**
8	t.e	21	t.e	34	t.e	47	t.e
9	t.e	22	t.e	35	t.e	48	t.e
10	t.e	23	t.e	36	t.e	49	t.e
11	t.e	24	t.e	37	t.e	50	t.e
12	t.e	25	t.e	38	t.e		
13	t.e	26	**0,77**	39	t.e		

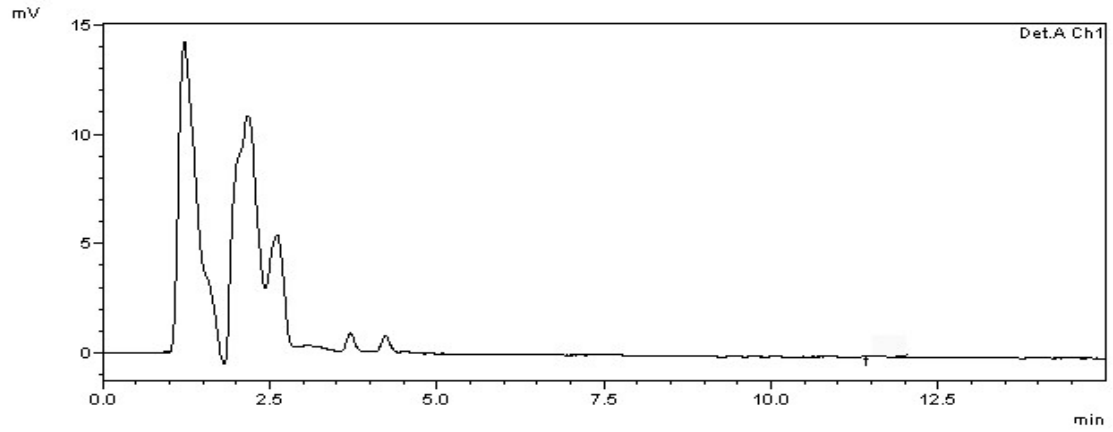
t.e: Tespit edilemedi ; <LOQ: Tayin sınırının altında

3.4.2 ve 3.4.3'de anlatıldığı şekilde analizleri yapılan üzüm pekmezine ait sonuçlar Tablo 4-6'de, OTA tespit edilmemiş üzüm pekmezi örneğine ait kromatogram Şekil 4-9'de, OTA tespit edilmiş üzüm pekmezi örneğine ait kromatogram ise Şekil 4-10'de gösterilmektedir.

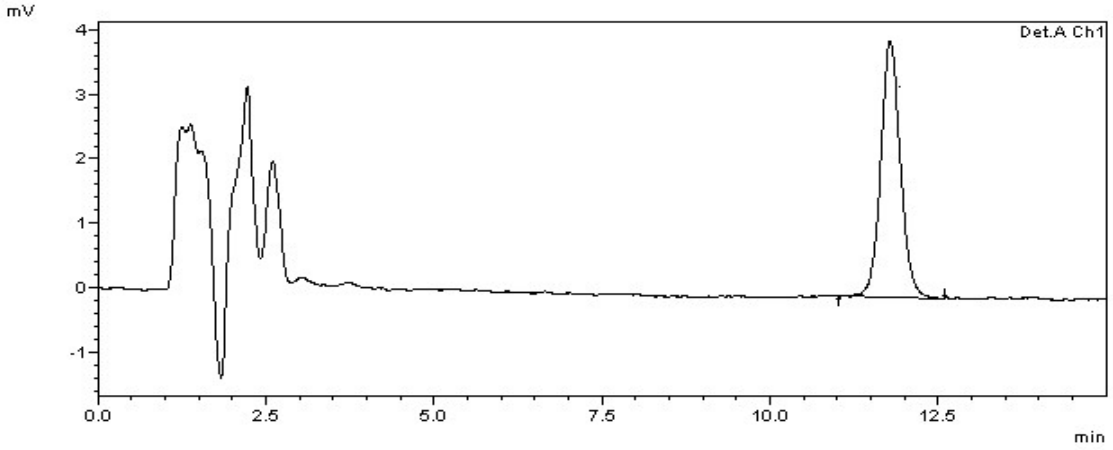
Tablo 4-6: Pekmez örneklerindeki OTA düzeyi

Örnek No.	OTA düzeyi (ppb)	Örnek No.	OTA düzeyi (ppb)	Örnek No.	OTA düzeyi (ppb)	Örnek No.	OTA düzeyi (ppb)
1	**<LOQ**	8	**2,17***	15	**3,46***	22	**1,40**
2	**2,04***	9	**3,87***	16	**0,90**	23	**1,35**
3	t.e	10	t.e	17	t.e	24	**2,73***
4	**1,32**	11	**1,18**	18	**0,63**	25	**2,36***
5	**3,01***	12	**0,55**	19	**2,48***		
6	**4,05***	13	**0,70**	20	**4,90***		
7	**2,03***	14	**1,49**	21	**2,69***		

*** :** Türk Gıda Kodeksi tarafından üzüm suyu ve üzüm suyu konsantresinde bulunabilecek maksimum OTA miktarı olan 2 ppb 'nin üzerinde OTA bulunan örnekler.

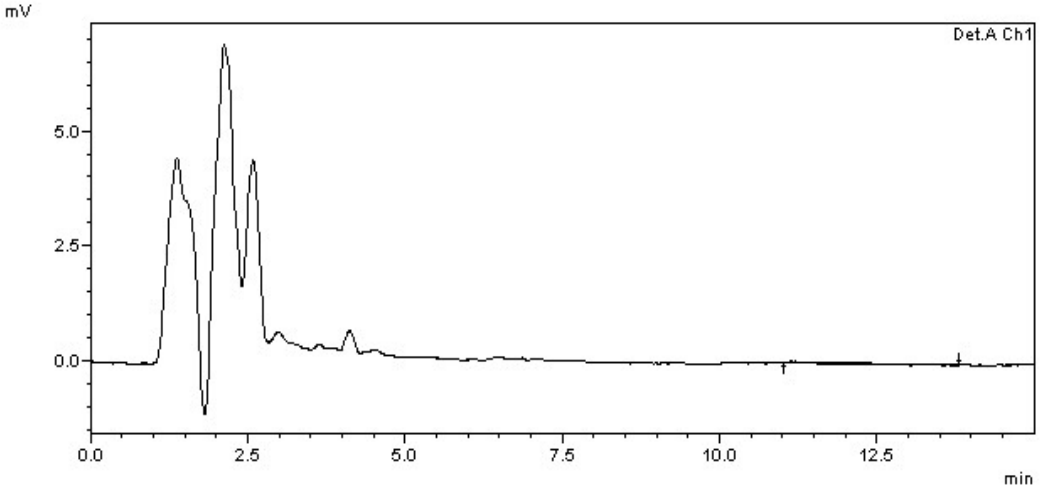


Şekil 4-9: OTA tespit edilmemiş pekmez örneğine ait kromatogram

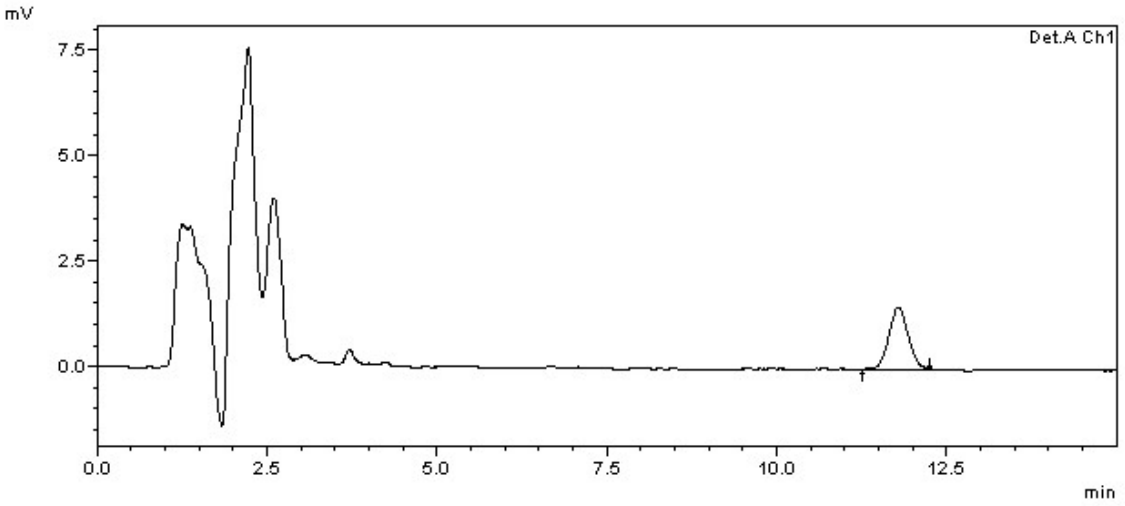


Şekil 4-10: 4,9 ppb OTA tespit edilmiş pekmez örneğine ait kromatogram

3.4.2 ve 3.4.3'de anlatıldığı şekilde analizleri yapılan üzüm suyuna ait sonuçlar Tablo 4-7'de, OTA tespit edilmemiş üzüm suyu örneğine ait kromatogram Şekil 4-11'de, OTA tespit edilmiş üzüm suyu örneğine ait kromatogram ise Şekil 4-12'de gösterilmektedir.



Şekil 4-11: OTA tespit edilmemiş üzüm suyu örneğine ait kromatogram



Şekil 4-12: 1,9 ppb OTA tespit edilmiş üzüm suyu örneğine ait kromatogram

Tablo 4-7: Üzüm suyu örneklerindeki OTA düzeyi

Örnek No.	OTA düzeyi (ppb)
1	**1,9**
2	t.e
3	**0,9**
4	t.e
5	t.e
6	t.e
7	t.e
8	t.e
9	t.e
10	t.e

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda, ülkemizin önemli ihraç ürünlerinden olan ve beslenme açısından büyük önem taşıyan kuru üzümde, ülkemize özgü geleneksel ürünlerimizden biri olan ve içerdiği minerallerin yanında iyi bir enerji kaynağı olması nedeniyle özellikle çocukların beslenmesinde tercih edilen bir ürün olan pekmezde ve yine üzümden elde edilen ve son yıllarda tüketimi yaygınlaşan üzüm suyunda OTA düzeyleri tayin edilmiştir.

OTA, *Penicillium verrucosum* ve *Aspergillus ochraceus* gibi bazı küf türleri tarafından üretilen bir mikotoksin türüdür. Yakın zamana kadar sadece mısır, buğday, arpa, çavdar, yulaf, pirinç gibi tahıl ürünlerine bulaştığı bilinirken günümüzde kuru meyve, yer fıstığı, kahve, kakao, baharatta, şarap, bira ve bazı hayvansal ürünlerde de OTA'ya rastlanmaktadır. Tarımsal ürünlerde OTA oluşumu uygun koşullar bulunduğu takdirde hasattan tüketime kadar hemen her aşamada meydana gelebilmektedir.

OTA bütün memelilerde akut ve kronik lezyonlara sebep olan önemli bir nefrotoksindir. İn vivo ve in vitro sistemlerde mutajenik etkisi kanıtlanmış, ancak etki mekanizması henüz açıklanamamıştır. IARC tarafından insanda muhtemel karsinojen madde (Grup 2B) olarak sınıflandırılmıştır. Diğer taraftan OTA, özellikle Balkan Ülkelerinde Tuna nehri kıyısı kırsal bölge insanlarında görülen BEN, Mısır'da ve Tunus'ta görülen ve etyolojisi bilinmeyen nefropatilerden ve böbrek tümörlerinden sorumlu tutulmaktadır. 1970'li yıllarda çoğunlukla tek mideli olan domuzlarda ve kümes hayvanlarında görülen toksik etkilerle, bu endemik hastalığın klinik ve patolojik özellikleri arasındaki çarpıcı benzerlikleri görülmesi üzerine OTA ile BEN arasındaki ilişkiyi çözmeye yönelik çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. BEN'in yaygın olduğu bölgelerde tüketilen tahıllarda ve domuz etinde OTA bulaşma oranının hastalığın görülmediği bölgelerdekilere göre yaklaşık 10 kez daha yüksek bulunması bu ilişkiyi doğrulayan ilk bulgulardır. Endemik nefropati görülen bölgelerde, kanda OTA'ya rastlanma sıklığının ve saptanan OTA düzeylerinin oldukça yüksek bulunması, ayrıca anne sütünde de rastlanması bu ilişkinin doğruluğunu desteklemektedir. Bu bulguları değerlendiren JEFCA nefrotoksik etkiyi göz önüne alarak tolere edilebilir günlük OTA alımını (TDI) 14 ng/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiş, karsinojenez ile ilgili bulguları değerlendiren SCF ise çok daha düşük bir değer olan günlük 0,5 ng/kg vücut ağırlığı seviyesini önermiştir (150).

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.

1999 yılında Avrupa Birliği 143 nolu Komisyon Direktifleri doğrultusunda "üye ülkelerdeki insanların diyetlerle OTA alımlarının değerlendirilmesi" ile ilgili kapsamlı bir araştırma yapılmasına karar verilmiştir. Bu araştırmada, katılımcılardan ülkelerindeki OTA maruziyetini ortaya koyabilmeleri için aşağıdaki bilgileri sağlamaları istenmiştir (113).

- Gıda ve içeceklerdeki OTA düzeyleri ile ilgili veriler
- Tüketim ile ilgili veriler
- Günlük alım ile ilgili tahminler
- Biyolojik sıvılardaki düzeyi ile ilgili veriler
- Anne sütünden bebeğe geçen OTA miktarı ile ilgili veriler

Araştıma sonuçlarını değerlendiren Avrupa Birliği yayımladığı Komisyon Direktifleri ile çeşitli ürünler için izin verilen maksimum OTA değerlerinde düzenlemeler yapmıştır. Birliğin 446/2002 Direktiflerinde bu değerler tahıllar ve tahıl taneleri için 5 ppb; insanların tüketimine sunulmuş işlenmiş tüm tahıl ürünleri için 3 ppb; kuru üzüm çeşitleri için 10 ppb olarak bildirilmiştir. Bebekler ve çocuklar için riskin çok daha fazla olduğu düşünülerek 683/2004 Direktiflerinde bu listeye bebek mamaları ve tahıldan yapılan bebek ve çocuk gıdaları (0,5 ppb) ile tıbbi amaçla ve özellikle bebekler için kullanılan diyet ürünleri (0,5 ppb) de dahil edilmiştir.

OTA ile ilgili limitler belirlenirken bir taraftan da SCF tarafından OTA'nın dağılımına ve toksik etki mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik araştırmalar sürdürülmüştür. Bu araştırmalarda tahıllar ve tahıl ürünleri dışında şarap, bira ve özellikle üzüm suyunun OTA için önemli maruziyet kaynakları oluşturduğunun ortaya çıkmasıyla 123/2005 Direktiflerinde şarap ve üzüm bazlı içecekler için maksimum OTA seviyesi 2 ppb olarak açıklanmıştır.

Bu kapsamlı çalışmanın 2002 yılında yayımlanan sonuçlarına göre OTA'nın bulaştığı ürünlerin dağılımı; tahıl ve tahıl ürünleri (%44), şarap (%10), kahve (%9), baharat (%3), bira (%7), kakao ve ürünleri (%5), kuru meyve (%4), et (%3) ve diğerleri şeklindedir. Diğerleri olarak gruplandırılan ürünlerin önemli bölümünü meyva sularının (üzüm suyu) oluşturduğu belirtilmektedir. Ancak, ürünlerdeki toksin seviyelerinde ülkelere göre büyük farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin; şarapta saptanan OTA düzeyi ülkelere göre 0,003-15,6 µg/kg arasında değişmektedir. Et örneklerinin sadece %18'inde OTA'ya rastlanmış olmasına karşın bazı ürünlerdeki düzeyin yüksek olduğuna dikkat çekilmektedir. Ayrıca, raporda araştırmaya katılan ülkeler için hesaplanan günlük OTA alım miktarları da yer almaktadır. En yüksek düzeyde OTA içeren ürüne ve bu ürünün tüketilen miktarına göre hesaplanan söz konusu değerler, ülkelerin beslenme alışkanlıklarına ve yaş gruplarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin, İngiltere'de, 16-64 arası yaş grubunun buğday ile aldığı OTA miktarı günlük 0,53 ng/kg vücut ağırlığı iken Hollanda'da bu değer 1,59 ng/kg vücut ağırlığı olarak hesaplanmıştır. Tahıl ürünleri esas alınarak hesaplanan günlük alım miktarları Fransa'da çocuklar için 3,39 ng/kg vücut ağırlığı, 2-65 arası yaş grubu için 2,51 ng/kg vücut ağırlığı, Almanya'da 4-6 yaş arası kız çocuklar için 3,14 ng/kg vücut ağırlığı olarak hesaplanmıştır.

Avrupa Birliği tarafından yürütülen bu kapsamlı araştırmanın bir diğer amacı da OTA'nın vücut sıvılarındaki düzeyleri ile ilgili verilerin toplanması ve günlük OTA alım miktarlarını daha sağlıklı hesaplayabilmek için bu değerlerden yararlanılması olarak belirlenmiştir. 6 Ülkeden (Almanya, İngiltere, İsveç, Norveç, İtalya ve İspanya) 2 712 örnek üzerinde yapılan araştırmada saptanan serum düzeyleri 0,01-5,58 µg/L; anne sütü düzeyleri ise 0,01- 0,24 µg/L arasında bulunmuştur. İtalya'dan alınan bir anne sütü örneğinde 2,85 µg/L OTA saptanması toksinin yeni doğanlar içinde önemli bir risk oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

Ülkemizde gıda olarak tüketilen ürünlerde mikotoksin kalıntılarının araştırılmasına yönelik çalışmalar ilk kez 1967 yılında Kanada'ya ihraç edilen fındıkların aflatoksin içermeleri nedeniyle iade edilmesinden sonra başlamış ve çoğunlukla aflatoksinlerle sınırlı kalmıştır. Bunu takip eden dönemde ise mikotoksin çalışmalarında önemli ölçüde bir artış göze çarpmaktadır. Türkiye'de 1997 yılında yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde (27) mikotoksinlerden sadece aflatoksinler, patulin ve ergot alkaloidleri için limit değerlere yer verilirken, 2002'de

yayımlanan “Gıda maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Belirlenmesi Hakkında Tebliğ” ile işlenmemiş tahıl taneleri, tahıllardan elde edilen bütün ürünler ve kurutulmuş asma meyveleri için maksimum OTA seviyeleri bildirilmiştir (28). 17/05/2008 Tarih ve 26879 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan 26 numaralı tebliğ ile gıda maddelerindeki OTA’nın maksimum limitleri yeniden belirlenmiş ve listeye kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve (5 ppb); kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve (10 ppb); şarap ve meyve şarapları (2 ppb); üzüm suyu, üzüm suyu konsantresi, üzüm nektarı ile doğrudan tüketime sunulan üzüm şırası (2 ppb); bebek ve küçük çocuk ek gıdaları (0,5 ppb) eklenmiştir (29).

Bugün OTA, gıda maddelerinde ve hayvan yemlerinde 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. Başlangıçta yapılmış olan çalışmalar daha çok 1997 yönetmeliğinde yer alan ürünlerle sınırlı kalmıştır. Bu ürünlerden hayvan yemlerinde 800 ppb’ye, tahıl ürünlerinde (buğday, arpa, yulaf, çavdar, mısır, pirinç) 130 ppb’ye kadar rastlanan OTA düzeyleri söz konusu ürünlerin hem insanlar hem de hayvanlar için tehlike oluşturduklarını ortaya koymaktadır. Bazı otoriteler, insanlara geçen OTA'nın asıl kaynağının hayvansal ürünler olabileceği görüşündedirler. Yemlerde bulunabilecek yüksek toksin miktarının, hayvanların organ, doku, süt ve yumurtalarında OTA kalıntısı düzeyini arttıracağı bu yol ile insanlara geçebileceği belirtilmektedir. Bazı işlenmiş tahıl ürünlerinde örneğin tarhanada ve baharatlarda limit değerlerin üstünde OTA’ya rastlanmasının, bu tür ürünlerin hazırlanması ve saklanması sırasında uygulanan yöntemlerin küf mantarlarını aktif hale getirip OTA üretebilmelerine imkan sağlamasının sonucu olduğu düşünülmektedir.

Son yıllarda özellikle ihracatta yaşanan krizler nedeniyle kuru meyvelerle ilgili çalışmalarda artış dikkati çekmektedir. Kurutulmuş meyveler her yaş grubu tarafından fazla miktarlarda tüketilen, iç ve dış piyasada önemli ekonomik potansiyele sahip gıda maddeleridir. Üzümlerin özellikle *Penicillium, Aspergillus, Mucor, Rhizopus*, *Cladosporium, Alternaria, Uncinula, Botrytis* ve *Plasmopara* cinsi küfler tarafından saldırıya uğradığı bilinmektedir. 1996 yılına kadar, üzümün mikotoksinle kontamine olmayan güvenilir bir meyve olduğu düşünülürken İsviçre’de yapılan bir çalışmada farklı coğrafik kökenli şarap örneklerinde OTA’nın saptanması bu görüşü değiştirmiştir

(130). Son on yıldır Avrupa Birliği, Japonya, Kanada, Arjantin gibi ülkelerde yapılan çalışmalar; üzüm, üzüm suyu, üzüm suyu konsantreleri, üzüm şırası ve şarap gibi üzümden yapılan ürünlerde OTA bulunabileceğini göstermektedir. Uzmanlar, şaraplarda rastlanan OTA seviyenin risk oluşturmadığına, ancak kırmızı üzüm sularında 100 ng/L'nin üzerindeki OTA düzeylerinin yeni doğanlar ve çocuklar açısından riskli olabileceğine dikkat çekmektedirler.

Kuru meyvelerin ve özelikle de kurutulmuş asma meyvelerinin ısı ve nem gibi faktörlere bağlı olarak oluşan aflatoksinler ve OTA için çok riskli ürünler olduğu uzmanlar tarafından belirtilmektedir. Türk Gıda Kodeksinin kurutulmuş asma meyveleri için (kuş üzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm dahil) belirlediği limit 10 ppb'dir. Ülkemizde kuru ve yaş üzümlerde yapılan incelemelerin büyük bölümü bölgesel taramalar niteliğinde olup, çoğu üzüm yetiştiriciliğinde önde gelen bölge olması sebebiyle Ege Bölgesini kapsamaktadır. 1998-2001 yıllarında Ege Bölgesindeki bağlardan toplanan yaş ve kuru üzümlerde yapılan incelemede 203 örneğin 82 sinde OTA tespit edilmiş ve düzeyin ağırlıklı olarak 10-50 ppb arasında olduğu belirtilmiştir (131). 1998-2006 yılları arasında farklı araştırıcılar tarafından ülkemizde değişik bağlardan elde edilen kuru üzüm örneklerinde yapılan araştırmalarda ise 0,26-34,84 ppb arasında değişen düzeylerde OTA'ya rastlanmıştır (132-135). Uzmanlara göre OTA oluşumu hasat öncesinde tarlada başlamakta, toprak OTA üreten mantar türlerinin dağılımında kaynak olarak rol oynamaktadır (46).

Çalışmamızda İstanbul'un çeşitli semtlerindeki pazar ve marketlerden toplanan 50 kuru üzüm, 25 pekmez ve 10 üzüm suyu örneğinin analizi yapılmıştır. Örneklerin analizinde Avrupa Birliği 2002 Eksperler raporunda yer alan ve valide edilmiş olan fluoresans dedektörlü ters faz HPLC yöntemi kullanılmıştır. İmmunoaffinite kolon ile örneklerin saflaştırılma işlemi ilk kez bu çalışmada pekmez örneklerine uygulanmış ve % 97,8 - % 101,7 arasında değişen aralıkta geri kazanım elde edilmiştir. Bu değerler Türk Gıda Kodeksinde ve Avrupa Birliği 2002 Eksperler raporunda yer alan OTA analiz metodları performans kriterleri ile uyumludur.

Çalışılan 50 kuru üzüm örneğinin 3'ünde 0,19 ppb, 1,07 ppb ve 2,59 ppb, bir örnekte ise tayin sınırının altında OTA saptanmıştır. Bu değerler Türk Gıda Kodeksinde kuru üzüm için belirtilmiş olan 10 ppb limitinin altında olup; diğer araştırmacıların elde ettiği değerlerden düşüktür. Bu farklılık, toksin üreten küflerin dağılımına veya

üzümlerin ait olduğu bölgelerdeki iklim koşularına bağlı olabileceği gibi kurutma ve saklama yöntemlerinde uygulanan iyileştirmelerin de bir sonucu olabilir.

Bu çalışmada, OTA içeriği yönünden incelenen diğer ürünler pekmez ve üzüm suyudur. Yapılan literatür araştırmalarında, bu ürünleri kapsayan ve ülkemizde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. 25 adet pekmez örneğinin 21 tanesinde (%84) 0,55-4,90 ppb aralığında değişen değerlerde, bir örnekte ise tayin sınırının altında OTA tespit edilmiştir. Pekmez örneklerinden 5 tanesi markasız olup, bu örneklerden bir tanesinde pekmez için belirtilen yasal limitin (2 ppb) üstünde OTA tespit edilmiştir. Markalı pekmez örneklerinden 18'inde (%90) OTA tespit edilmiş olup, bunlardan 12 tanesinde OTA değeri yasal limitin üstündedir. Pekmezde saptanan en yüksek OTA değeri 4,90 ppb, ortalama değer ise 1,83 ppb'dir. Tümü markalı olan 10 üzüm suyu örneğinden iki tanesinde, 2 ppb olan yasal limitin altında (0,9 ppb; 1,09 ppb) OTA tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar, üzüm ve üzüm ürünlerinin OTA açısından risk oluşturduklarını doğrulamaktadır. Özellikle, ülkemize özgü geleneksel ürünlerimizden biri olan ve içerdiği mineraller yanında iyi bir enerji kaynağı olması nedeniyle çocuklara ve hastalara önerilen pekmezde yasal limitin üstünde OTA tespit edilmesi düşündürücüdür. Geleneksel ve modern yöntemler uygulamak suretiyle üzüm şırasının konsantre edilmesiyle hazırlanan pekmezdeki OTA düzeyinin kuru üzüm ve üzüm suyuna kıyasla daha yüksek olması şaşırtıcı değildir. Nitekim bir araştırmada OTA içeren üzümlerin pekmeze işlenmesi durumunda pekmezdeki OTA miktarının üzümlere göre 5-6 kat arttığı tespit edilmiştir (139).

Çalışmamızın sonucunda, incelenen ürünlerden sadece pekmezin OTA içeriği yönünden risk oluşturduğu düşünülebilir. Kuru üzüm ve üzüm suyu örneklerinde rastlanan değerler yasal limitlerin altındadır. Ancak kuru üzüm için Türk Gıda Kodeksi'nde konulmuş olan limit (10 ppb) kanımızca yüksek bir değerdir. Kimyasal maddeler için belirlenen limitlerin, yeni araştırma sonuçları ortaya çıktıkça değişikliğe uğrayabildiği bilinmektedir. İnsanlar için olası karsinojenler grubunda sınıflandırılan OTA'nın karsinojen etki mekanizması henüz kesin olarak aydınlatılabilmiş değildir. Bu nedenle gıda ürünlerinde saptanan ve limitin altında bulunan değerlerin de dikkatle değerlendirilmesi gerekmektedir. Diğer bir önemli nokta ise bu değerlerin birçok ülkede

beslenme alışkanlıklarına göre ve her ürün için günlük tüketilen miktarlar esas alınarak hesaplanmakta olmasıdır.

Türkiye, gerek coğrafi ve gerekse ekolojik özellikleri itibariyle bağcılığa çok elverişlidir. Üzümler; taze olarak, kurutularak, pekmez, pestil gibi yöresel ürünlere işlenerek, üzüm suyu, üzüm suyu konsantresi ve şarap yapılarak ve bunun yanında, sirke ve rakı yapımında kullanılarak tüketilmekte ise de en çok kurutularak ve pekmez yapılarak değerlendirilmektedir. Pekmez özellikle kırsal kesimde yaşayan insanlar ve çocuklar için önemli bir enerji kaynağıdır. Diğer taraftan son yıllarda halk arasında antioksidan özelliği olan gıdalara karşı artan ilgi pekmez, üzüm suyu ve kuru üzüm tüketimini de önemli ölçüde arttırmıştır. Bu nedenle OTA riski taşıyan gıdalar için günlük tüketilen miktarların hesaplanması büyük önem taşımaktadır. Günlük tüketilen miktarlar ile ilgili sağlıklı veriler elde edildiğinde ürün bazında toplam alınabilecek OTA miktarlarını tahmin etmek mümkün olacaktır. Ülkemizde bu konuda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, pekmezde saptadığımız en yüksek OTA değerini esas alarak yaptığımız hesaplamada, her gün bir yemek kaşığı pekmez (yaklaşık 19,4 g) yenmesi durumunda 70 kg ağırlığında bir yetişkinin alacağı günlük OTA miktarı 1,4 ng'dır. Bu değer, SCF tarafından önerilen değerin (0,5 ng/kg vücut ağırlığı) yaklaşık üç katıdır.

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

1. World Health Organisation (WHO). Environmental Health Criteria 11, Mycotoxins. WHO, Geneva, Switzerland 1979, http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm

2. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Micr Rev 2003; **16(3)**:497-516.

3. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Tox Lett* 2002; **127:**19-28.

4. Omurtag GZ. Mikotoksinli besinlerin oluşturacağı tehlikeler. *Clinic* 2002; **1**:34-37.

5. Yurdun T. Aflatoksinler üzerine kısa açıklama. *Mar Üni Ecz Dergisi* 1996; **12:**1-8.

6. Williams JH, Philips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 2004; **80:**1106-1122.

7. World Health Organisation (WHO). Environmental Health Criteria 105, Selected mycotoxins: Ochratoxins, Trichotecenes, Ergot. WHO, Geneva, Switzerland 1990, http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc105.htm

8. Varga J, Kevei E, Tren J, Kozakiewic Z. Ochratoxin production by Aspergillus species. *Appl Environ Microbiol* 1996; **62:**4461-4464.

9. Otteneder H, Majerus P. Ochratoxin A in coffee: Nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995 - 1999. *Food Add Contam* 2001; **18**:431-435.

10. Roset M. Survey on Ochratoxin A in Grape Juice. *Fruit Processing* 2003; 167 - 172.

11. Pena A, Cerejo F, Lino C, Silveira I. Determination of Ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem* 2005; **382**:1288-1293.

12. Arino A, Herrera M, Estopanan G, Juan T. High levels of Ochratoxin A in licorice and derived products. *Int J Food Microbiol* 2007; **114(3)**:366-369.

13. Tafuri A, Ferracane R, Ritieni A. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chem* 2004; **88**:487-494.

14. Araguas C, Gonzalez-Penas E, Lopez de Cerain A. Study on Ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food Chem* 2005; **92**: 459-464.

15. Visconti A, Pascale M, Centonze G. Determination of Ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2000; **888:**321-326.

16. Burdaspal P, Legarda TM, Gilbert J. Determination of Ochratoxin A in baby food by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. *J AOAC Int* 2001; **84 (5)**,1445-1452.

17. Thirumala-Devi K, Mayo MA, Reddy G, Emmanuel KE, Larondelle Y, Reddy DV. Occurrence of Ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. Food Add Contam 2001; **18:**830-835.

18. Şenyuva HZ, Gilbert J, Özcan S, Ulken U. Survey for co-occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin B1 in dried figs in Turkey by using a single laboratory-validated alkaline extraction method for Ochratoxin A. *J Food* 2005; **68(7):**1512-1515.

19. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some naturally occuring substances: Food items and constituents, aromatic amines and mycotoxins, International Agency for Research on Cancer, Lyon 1993; **56:** 489-521.

20. O'Brien E, Dietrich DR. Ochratoxin A: The continuing enigma. *Crit Rev Toxicol* 2005; **35(1)**: 33-60.

21. Hall PW, Ramin GJ. Investigation of chronic endemic nephropathy in Yugoslavia. *Am J Med* 1965; **39**:210-217.

22. Categnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC Scientific Publications No. 115, *Oxford University Pres* 1991, Oxford U.K.

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

24. Hassen W, Abid-Essafi S, Achour A, Guezzah N, Zakhama A, Fariella E, Creppy EE, Bacha H. Karyomegaly of tubuler kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: Respective role of Ochratoxin A and possible genetic predisposition. *Human Exp Toxicol* 2004; **23**:339-346.

25. Wafa EW, Yahya RS, Sobh MA, Eraky I, El-Baz M, El-Gayar HA, Betbeder AM. Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: A preliminary study. Human Exp Toxicol 1998; **17(2):**124-129.

26. Van Egmond HP, Castegnaro EM, Plestina R, Dirheimer G, Chemozemsky IN, Bartsch H. Worldwide regulations for Ochratoxin-A, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon 1991; 331-336.

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

28. T.C. Resmi Gazete, 23 Eylül 2002. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ. Sayı: 24885, Tebliğ No: 2002/63.

29. T.C. Resmi Gazete, 17 Mayıs 2008. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ. Sayı: 26879, Tebliğ No: 2008/26.

30. Erdoğan A, Gürses M. Gıdalar üzerinde Penicillium cinsi küfler tarafından oluşturulan bazı mikotoksinler. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu 18-19 Eylül 2003; İstanbul, 111-116.

31. Ergönül B, Kundakçı A. Et ve et ürünlerinde mikotoksin sorunu ve mikotoksikozis. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003; İstanbul, 35-40.

32. Omaye ST. Book reviews.*Food and Nutritional Toxicology* 2004. CRC Press LLC, Boca Raton London, New York, Washington, D.C., Chapter 13.

33. Karadeniz F, Ekşi A. Gıdalarda Mikotoksin Oluşumu ve Azaltılması. *Dünya Gıda Dergisi* 2002; 104.

34. Moss MO. Mycotoxin review- 1. Aspergillus and Penicillium. *Mycologist* 2002; **16(3):**116-119.

35. Smith JE. Mycotoxins. In Food Chemical Safety Volume 1: Contaminants; Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Abington Hall, Abington, Cambridge CB1 6AH England 2001, Part II: Particular Contaminants. Secion 11

36. Kabak B, Var I. Meyve Suyu ve Şaraplarda Mikotoksin Varlığı. *Dünya Gıda Dergisi 2006;* Kasım, 73-79.

37. Krska R, Molinelli A. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Anal Bioanal Chem* 2007; **387**:145–148.

38. Var I, Kabak B, Özkaşarlı M. Mikotoksin Aranmasında Kullanılan Analiz Yöntemleri *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 2004; **2:**1-11 www.mikrobiyoloji.org/pdf/702041101.pdf

39. Karagözlü N, Karapınar M. Bazı tahıl ve ürünlerinde Okratoksin A ve fungal kontaminasyon. *Turk J Biol* 2000; **24**:561 – 572.

40. Karagözlü N. Çekirdeksiz Okratoksijenik küflerin üremesine ve okratoksin sentezine etki eden faktörler ve bazı gıdalarda okratoksin A dağılımı üzerine bir araştırma. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D., Doktora Tezi; 1998 İzmir.

41. Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses. An Overview. *International Journal of Food Microbiology* 2007; **119**:3–10.

42. Gürsoy N, Biçici M. Çukurovada buğday ve mısır ürünlerinde saptanan fungal infeksiyonlar ve sonuçlanan bazı mikotoksinler. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003; İstanbul, 68-74.

43. Sage L, Garon D, Murandi SF. Fungal Microflora and Ochratoxin A Risk in French Vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; **52:**5764-5768.

44. Golob P. Good Practıces For Anımal Feed And Lıvestock 1: Training Manual. In On-Farm Mycotoxın Control In Food And Feed Graın. Food And Agrıculture Organızatıon Of The Unıted Natıons 2007; Rome, 1-10.

45. Doyle MP, Beuchat LR, ve Montville TJ. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, ASM Press 1997, Washington D.C.

46. Bozoğlu F. Mikotoksinlerin oluşum mekanizması. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003; İstanbul, 17-22.

47. Kabak B, Dobson ADW, Var I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2006; **46(8)**:593-619

48. Heperkan D. Gıdalarda mikotoksinler ve ülkemiz açısından önemi. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu 18-19 Eylül2003; İstanbul, 1-7.

49. Güray Ö, Vural N. Mikotoksinlerle meydana gelen besin zehirlenmeleri münasebeti ile aflatoksinler üzerine bir araştırma. *Ankara Üniv Tıp Fak Mec* 1968; **21**;1030.

50. Akşehirli M, Bozkurt M. Memleketimiz fındık, fıstık, badem içi ve cevizlerde aflatoksin bakımından bir araştırma. *Türk Hij Tec Biyo* 1969; **29**:103.

51. Bozkurt M, Göksoy N. A study of Aflatoxins in Turkish Pistacho Nuts. *Türk Hij Tec Biyo*1972; **32:** 221.

52. Yurdun T, Omurtag GZ, Ersoy Ö. İnsidence of patulin in apple juices marketed in Turkey. *J Food prot* 2001; **64 (11)**:1854-1853.

53. Omurtag GZ, Beyoğlu D. Occurence of deoxynivalenol (vomitoxin) in processed cereals and pulses in Turkey. *Food Addit Contam* 2003; **20 (4)**: 405-409.

54. Omurtag GZ, Yazıcıoğlu D. Determination of T-2 toxin in grain and grain products by HPLC and TLC. *J Environ Sci Health Part B* 2000; **35 (6):** 797-807.

55. Omurtag GZ, Yazıcıoğlu D. Occurence of T-2 toxin in processed cereals and pulses in Turkey determined by HPLC and TLC. *Food Addit Contam* 2001; **18(9)**: 844-849.

56. Omurtag GZ. Determination of Fumonisin B1 and B2 in corn and corn-based products in Turkey by HPLC. *J Food Prot* 2001; **64 (6)**:873-876.

57. Omurtag GZ, Yazıcıoğlu D. Determination of Fumonisin B1 and B2 in herbal tea and medicinal plants in Turkey by HPLC. *J Food Prot* 2004; **67(8)**: 1782-1786.

58. Yurdun T, Omurtag GZ, Ersoy Ö. Aflatoxins contamination in peanut butters and spices in İstanbul. *J Fac Pharm İstanbul* 2001; **34(1)**: 41-48.

59. Meşeci N. Tahıl ve tahıl ürünlerinde Okratoksin A seviyesinin araştırılması, M. Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi; 1999 İstanbul. (Danışman: Prof. Dr. Buket Alpertunga).

60. Özçelik N, Soysal D. Okratoksin A: Endemik nefropati ile ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi* 1998; **8**:173-6.

61. Creppy EE. Human ochratoxicosis. *Journal of Toxicology* 1999; **18**: 277-93.

62. Gekle M, Silbernagl S. Renal toxicodynamics of Ochratoxin A: A pathophysiological approach. *Kidney Blood Pressure Res* 1996; **19:** 225-35.

63. Petzinger E, Ziegler K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J Vet Pharmacol Therap* 2000; **23**:91-8.

64. Ferrufino- Guardia EV, Tangni EK, Larondelle Y, Ponchaut S. Transfer of Ochratoxin A during lactation: exposure of suckling via the milk of rabbit does fed a naturally- contaminated feed. F*ood Additives and Contaminants* 2000; **17**: 167-75.

65. Maaroufi K., Achour A, El May M, Betbeder AM, Ellouz F, Creppy E, Bacha H. Ochratoxin A in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. *Hum Exp Toxicol* 1995; **14**: 609-615.

66. Hult K, Plestina R, Habazin-Novak V, Radic B, Ceovic S. Ochratoxin A in human blood and Balkan Endemic Nephropathy. *Arch Toxicol* 1982; **51**:313-321.

67. Nicolov IG, Chernozemsky IN, Petkova-Bocharova T, Stoyanov IS, Stoichev I. Epidemiologic characteristics of urinary system tumours and Balkan Nephropathy in an endemic region of Bulgaria. *Eur J Cancer* 1978; **14**:1237-1242.

68. Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. Ochratoxin A, atoxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus. *Wilh Nature* 1965; **205**:1112-1113.

69. O'Callaghan J, Caddick MX, Dobson ADW. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in Aspergillus ochraceus. *Microbiology* 2003; **149**:3485–3491

70. Frenettea C, Paugha R, Tozlovanub M, Juziob M, Leszkowiczb AP, Manderville RA. Structure–activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites. *Analytica Chimica Acta* 2008; **617(2)**: 153-161.

71. Ringot D, Changoa A, Schneider YJ, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions 2006;* 159:18-46.

72. Park DL, Ayala CE, Guzman-Perez SE, Garcia RL, Trujillo S. Microbial Toxins in Foods: Algal, Fungal, and Bacterial. *Food Toxicology* 2000; **5.**

73. Krogh P. Role of ochratoxin A in diseease causation. *Food Chem Toxicol* 1992; **3**:213-224.

74. Huff W, Hamilton PB. Mycotoxins their biosynthesis in fungi ochratoxins:metobolites of combined pathways. *J Food Protec* 1979; **42(10)**:815-820.

75. Gümüş T. Arpa, malt ve birada okratoksin A (OTA) varlığı ve bira üretimi sırasında OTA'nın maya tarafından parçalanması, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi 2002.

76. Bucheli P, Taniwaki MH. Review Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Addit Contam* 2002; **7**:655 – 665.

77. Bayman P, Baker J, Doster M, Michailides T, Mahoney N. Ochratoxin production by the Aspergillus ochraceus group and Aspergillus alliaceus. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68**: 2326 – 2329.

78. Larsen T, Svendsen A, Smedsgaard J. Biochemical characterization of ochratoxin A- Producing strains of genus Penicillium. *Appl Environ Microb* 2001; **67:** 3630 – 3635.

79. Okratoksin A ve melatoninin ratlarda bazı serum ve karaciğer enzim düzeylerine etkisi. Mustafa Soyöz Tıbbi Bioloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 2002 (Tez danışmanı Prof. Dr. Nurten Özçelik)

80. Pohland AE, Nesheim S, Friedman L. International union of pure and applied Chemistry division commision on food chemistry ochratoxin A: A review *Pure & Appl. Chern* 1992; **64(7)**:1029-1046.

81. Samson RA, Van Reenen- Hoekstra BS. Introduction to Food-borne Fungi 3rd ed. Centraalbureau vor Schimmelcultures, Baar; 1988.

82. Quiroz M, Rios O, Barel M, Guyot B, Guıraud J, Galindo S. Effect of chemical and environmental factors on Aspergillus ochraceus growth and toxigenesis in green coffee. *Food Microbiol* 2004; **21**: 629-634.

83. Galtier P. Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology-ochratoxin A. *Vet. Sci. Commun* 1978; **1**: 349-358.

84. Roth A, Chakor K, Creppy EE, Kane A, Roschenthaler R, Dirheimer G. Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* 1988; **48**: 293.

85. Lee SC, Beery JT, Chu FS. Immunohistochemical fate of ochratoxin A in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; **72**: 218.

86. Dietrich DR, Heussner AH, O'Brien E.Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). *Food Additives and Contaminants* 2005; **1**: 45–52.

87. Sokol PP, Ripich G, Peter D, Ross H-CR. Mechanism of Ochratoxin A transport in kidney. J*ournal of Pharmacology and Exp Therap* 1988; **246:**460-465.

88. Chang CF, Hamilton PB. Impairment of phogocytosis by heterophils from chickens during ochratoxicosis. Environ Microbiol 1980; **39**:572-575

89. Zingerle M, Silbernagl S, Gekle M. Reabsorption of the nephrotoxin Ochratoxin A along the rat nephron in vivo. *Journal of Pharmacology and Exp Therap* 1997; **280**: 220-4.

90. Schwerdt G, Bauer K, Gekle M, Silbernagl S. Accumulation of ochratoxin A in rat kidney in vivo and in cultivated renal epithelial cells in vitro. *Toxicology* 1996; **114**: 177-85.

91. Prior MG. Mycotoxin determinations on animal feedstuffs and tissues in Western Canada. *Can J Comp Med* 1976; **40:** 75-79

92. Dahlman A, Dantzler WH, Silbernagl S, Gekle M. Detailed mapping of ochratoxin A reabsorbtion along the rat nephron in vivo: the nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998; **286**: 157-162

93. Petzinger E, Ziegler K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J Vet Pharmacol Therap* 2000; **23**: 91-98.

94. Yiannikouris A, Jouany JP. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research* 2002; **51**: 81-99.

95. Marquardt RR, Frohlich AA. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J Anim Sci* 1992; **70**: 3968-3988.

96. Hohler D. Ochratoxin A in food and feed occurence, legislation and mode of action. *Ernahrungsweiss* 1998; **37**:2-12.

97. Rasonyi T, Schlatter J, Dietrich DR. The role of a-2u-globulin in ochratoxin A induced renal toxicity and tumors in F344 rats. *Toxicology Letters* 1999; **104**: 83-92.

98. Gautier JC, Holzhaeuser D, Markovic J, Gremaud E, Schilter B, Turesky J. Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; **30**:1089-98.

99. Zepnik H, Pahler A, Schauer U, Dekant W. Ochratoxin A induced tumor formation: Is there a role of reactive Ochratoxin A metabolites? *Toxicological Sciences* 2001; **59**: 59-67.

100. Huff JE. Carcinogenicity of Ochratoxin A in experimental animals. *IARC Sci Publ* 1991; **115**: 229-44.

101. Kane A, Creppy EE, Röschenthaler R, Dirheimer G. Changes in urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of Ochratoxin A in rats. *Toxicology* 1986; **42**: 233- 43.

102. Garip İ. Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan biralık arpa, malt ve birada Okratoksin A düzeylerinin belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Doktora Tezi, Konya 2000.

103. Jonsyn-Ellis FE. Seasonal variation exposure frequency and concentration levels of Aflatoxins and Ocratoxins in urine samples of boys and girls. *Mycopathologica* 2000; **152**:35.

104. Grosso F, said S, Mabrouk I, Fremy JM, Castegnaro M, Jemmali M, Dragacci S. New data on the occurence of Ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food Chem Toxicol* 2003; **41:**1133-1140.

105. Agawane SB, Lonkar PS. Effects of probiotic containing Saccharomyces boulardii on experimental ochratoxicosis in broilers: hematobiological studies. *J Vet Sci* 2004; **5:** 359-367.

106. Storen O, Holm H, Stormer F C. Metabolism of Ochratoxin A by rats. *Applied and Environmental Microbiology* 1982; **44**: 785-789.

107. Golinski P, Hult K, Szczesna J, Chelkowskki J, Kneblewski P, Szebiotko K. Mycotoxic porcine nefropthy and spontaneus occurence of ochratoxin A residues in kidney and blood of Polish swine. *Applied and Environmental Microbiology* 1984; **47**: 1210-1212.

108. Fukui Y, Hoshino K, Kameyana Y, Yashui T, Toda C, Nagano H. Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain. *Food Chem Toxicol* 1987; **25:**17-24.

109. Kuiper-Goodman T, Scott PM. Risk Assessment of the Mycotoxin Ochratoxin A. *Biomed Environ Sci* 1989; **2**: 179-248.

110. Subramanian S, Kanthasamy A, Balasubramanian N, Sekar N, Govindasamy S. Ochratoxin A toxicity on carbohydrate metabolism in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1989; **43**: 180.

111. Waren MF, Hamilton PB. Inhibition of the glycogen phosphorylase system during ochratoxicosis in chickens. *Appl Environ Microbiol* 1980; **40**: 522.

112. Krogh P. *Mycotoxins In Food*. London. Academic Press: 1987; **97**:149-193.

113. Food Safety Comission Malta- European Union Regulations (FOOD), http://www.health.gov.mt/fsc/fsc_foodeureg.htm

114. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Gıdalarda Katkı-Kalıntı ve Bulaşanların İzlenmesi. Bursa; 107-130,1996.

115. Taydaş EE. Kırmızı biberlerde aflatoksin ve okratoksin oluşumu üzerine araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1993.

116. Baydar T, Engin AB, Girgin G, Aydin S, Sahin G. Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Ann Agric Environ Med* 2005; **12**:193-197.

117. Şeviktürk İ, Gönülalan Z. Kayseri'de Tüketime sunulan bazı tahıl ürünlerinde Okratoksin A miktarları. *Journal of Health Sciences* 2007; **16(2):**86-90.

118. Kabak B. Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: Occurrence and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol*. (2008); **47(2):** 348-352.

119. Ruşen M. Türk kahvesi örneklerinde Okratoksin A varlığı. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.Yüksek Lisans Tezi; 2006 Tekirdağ.

120. Aksoy U, Sabır E, Eltem R, Kıraç S, Sarıgül N, Meyvacı B, Ateş M, Çakır M. Kuru incirlerde Okratoksin A'nın potansiyel kontaminasyon riskinin araştırılması. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, Sözlü Bildiri, 18-19 Eylül 2003; İstanbul.

121. Demir T, Özar Aİ, Gülsevim O, Çoksöyler N, Aksoy U, Düzbastılar M. Ege Bölgesinde incirlerde görülen aflatoksin, Okratoksin A oluşumu ile önlenmesi üzerinde araştırma, Proje Nihai Raporu, KKGA/B/03/F/052.

122. Karbancioğlu-Güler F, Heperkan D. Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs. *Analytica Chimica Acta* 2008; **617**:32-36.

123. Batu A, Yurdagül Ü. Değişik katkıların kullanımı ile beyaz katı kuru üzüm pekmezi eldesi üzerine araştırmalar. *Gıda Derg* 1993; **18(3)**:157-163.

124. Batu A. Production of liquid and white solid pekmez in Turkey. *Journal of Food Quality* 2005; **28**:417–427.

125. Taşkaya B. Kuru Üzüm. Tarımsal Ekonomi Arastırma Enstitüsü, T.E.A.E – Bakıs 2003; ISSN 1303-8346, 3:7.

126. Nazlı C. Üzüm. Tarımsal Ekonomi Arastırma Enstitüsü, T.E.A.E – Bakıs 2003; ISSN 1303-8346, 9:11. http://www.aeri.org.tr.

127. Aytekin M. Yenicekent Kasabasında Bağcılık. Buldan Sempozyumu Bildirileri Kitabı 2006; 989-998.

128. Seçer E, İç E. Kuru Üzümlerde Küflenmeye Neden Olan Aspergillus Niger van Tieghem'e Gama Işınlamasının Etkisi. VIII. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi Sözlü Bildiriler Kitabı. 15-17 Ekim 2003. Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

129. Anonim, 1989. Üzüm Pekmezi Standardı. TS. 3792 Eylül 1989.

130. Zimmerli B, Dick R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 1996; **13**:655-668.

131. Eltem R, Aksoy U, Altındişli A, Sarıgül N, Taşkın E, Aşkun T, ve ark. Ege Bölgesinde Çekirdeksiz Kuru Üzümlerde OTA Oluşumunun Belirlenmesi. I.Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003; İstanbul, 54-59.

132. Tosun H, Demirel N, Çoban H. Üzüm ve Üzüm Ürünlerinde Okratoksin A Sorunu C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi ISSN 1305-1385 C.B.U. *Journal of Science* 2006; 141-145.

133. Meyvacı KB, Altındişli A, Aksoy U, Eltem R, Turgut H, Arasiler Z, Kartal N. Ochratoxin A in Sultanas From Turkey I: Survey of Unprocessed Sultanas From Vineyards and Packing-Houses. *Food Additives and Contaminants* 2005; **22(11):**1138–1143.

134. Çağlarırmak N. Ochratoxın A, Hydroxymethylfurfural and Vitamin C Levels of Sun-Dried Grapes and Sultanas. *Journal of Food Processing and Preservation* 2006; **30:**549–562

135. Çelik C. Adana'da bazı marketlerde satışa sunulan çekirdeksiz kuru üzümlerde Okratoksin A varlığının HPLC yöntemi ile araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana. 2008.

136. Aksoy U, Eltem R, Meyvacı KB, Altındişli A, Karabat S. Five-Year Survey of Ochratoxin A in Processed Sultanas From Turkey. *Food Additives and Contaminants* 2007; **24(3)**:292–296.

137. Var I, Yalçındağ D. Determination of Ochratoxin A by Elisa and Isolation of Moulds from Grapes and Raisins Sold in Markets and Bazaar. The 2nd Safoodnet Seminar. 22-23 October 2007, İstanbul.

138. Anlı E., Çabuk, B., Vural, N., Başpınar, E. (2005) Ochratoxin A In Turkish Wines. *J. Food Biochem*., **29**, 611-623.

139. Arıcı M, Gümüş T, Kara F. The fate of Ochratoxin A during the pekmez production from mouldy grapes. *Food Control* 2004; **15:** 597- 600.

140. T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilat Müsteşarlığı. Çekirdeksiz kuru üzümlerde okratoksin A oluşumunun incelenmesi ve potansiyel okratoksijenik küflerin izolasyonu ve identifikasyonu. Proje Kod No. 1999 DPT/001. Yürütücü: Rengin Eltem. Bornova İzmir 2004.

141. Çelik H, Marasal B, Söylemezoğlu G, Tangolar S, Gündüz M. Bağcılıkta üretim hedefleri 2003. www.bagcilik.org/dosyalar/uretim_hedefleri.pdf.

142. Osrtry V, Ruprich J, Skartova J. Raisins, Ochratoxin A and Human Health. 24.Mykotoxin-Workshop; Program Abstracts der Vorträge und Poster Teilnehmerverzeichnis, Berlin-Marienfelde 2002

143. Stefanaki I, Foufa E, Tsatsou-Dritsa A, Dais P. Ochratoxin A Concentrations in Greek Domestic Wines and Dried Vine Fruits. *Food Additives and Contaminants* 2003; **20**:74–83.

144. Moller TE, Nyberg M. Ochratoxin A in Raisins and Currants: Basic Extraction Procedure Used in Two Small Marketing Surveys of the Occurrence and Control of the Heterogeneity of the Toxins in Samples. *Food Additives and Contaminants* 2003; **20**:1072-1076.

145. Magnoli C, Astoreca A, Ponsone L, Combina M, Palacio G, Rosa CAR ve ark. Survey of Mycoflora and Ochratoxin A in Dried Vine Fruits from Argentina Markets. *Letters in Applied Microbiology* 2004; **39**:326–331.

146. Romero SM, Comeria RM, Larumbe G, Ritieni A, Vaamonde G, Pinto VF. Toxigenic Fungi Isolated From Dried Vine Fruits in Argentina. I*nternational Journal of Food Microbiology* 2005; **104**:43– 49.

147. Iamanaka BT, Taniwaki MH, Menezes HC, Vicente E, Fungara MHP. Incidence of Toxigenic Fungi and Ochratoxin A in Dried Fruits Sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants* 2005; **22(12)**:1258–1263.

148. Zinedine A, Soriano JM, Juan C, Mojemmi B, Molto JC, Bouklouze A, Cherrah Y ve ark. Incidence of Ochratoxin A in Rice and Dried Fruits from Rabat and Sale Area, Morocco. *Food Additives and Contaminants* 2007; **24(3)**:285- 291.

149. Hışıl Y. Enstrümental Gıda Analizleri (I). Ege Üniversitesi. Basımevi, Bornova-İzmir 1999.

150. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-2-13_final_report_organotins_en.pdf. Reports on tasks for scientific cooperation, Assesment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States. Annex 1, 27-29, 2002.

151. Zimmerli D, Dick R. Determination of Ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detaction and immunoaffinity column cleanup. Methodology And Swiss data. *Journal of Chromatography B* 1995; **666**: 85-89.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşe Sibel	**Soyadı**	Ünal
Doğ.Yeri	İstanbul	**Doğ.Tar.**	03.10.1983
Uyruğu	T.C	**TCKim No**	37894839966
Email	aysesunal@mynet.com	**Tel**	0533 217 81 78

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2006
Lise	St. Georg Avusturya Lisesi ve Ticaret Okulu	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Yüksek Lisans Öğrencisi	İ.Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	2006-2008

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**İ.Ü Yabancı Diller Bölümü Puanı**
Almanca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	-	74
İngilizce	Iyi	Orta	Orta	-	-

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	64,960	63,844	62,728

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	Çok İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri: Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Apoptozis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri Kurs Katılım Belgesi, Türkiye Biyokimya Derneği HPLC ve Uygulama Alanları Workshop Eğitimi Katılım Belgesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi Teorik Kursu Katılım Belgesi

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Müzik, tiyatro, edebiyat