

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KIRMIZI ŞARAPTA OKRATOKSİN A VE FUMONİSİN B₂ VARLIĞININ
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceren DEĞİRMENCİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

EYLÜL 2013

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KIRMIZI ŞARAPTA OKRATOKSİN A VE FUMONİSİN B₂ VARLIĞININ
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ceren DEĞİRMENCİ
(506111509)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Z. Dilek HEPERKAN

EYLÜL 2013

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506111509 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Ceren DEĞİRMENCİ**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**KIRMIZI ŞARAPTA OKRATOKSİN A VE FUMONİSİN B₂ VARLIĞININ İNCELENMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Z. Dilek HEPERKAN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gülden OMURTAG**
Marmara Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **3 Eylül 2013**
Savunma Tarihi : **11 Eylül 2013**

Sevgili Aileme,

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca araştırmamın gerçekleştirilmesi, geliştirilmesi ve değerlendirilmesi konusunda desteklerini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Dilek HEPERKAN'a teşekkür ederim. Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan çok sevgili ağabeyim Cem DEĞİRMENCİ, anne ve babam Süreyya – Nurettin DEĞİRMENCİ başta olmak üzere tüm aileme, Ar. Gör. Ceren DAŞKAYA' ya teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca her konuda desteklerini esirgemeyen ve pozitif enerjileriyle bana güç veren sevgili arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Eylül 2013

Ceren Değirmenci
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. KIRMIZI ŞARAP	3
2.1 Şarap Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.2 Şarap Üretimi ve Ekonomik Veriler.....	3
2.3 Kırmızı Şarap Üretimi ve Şarapta Kalite Kriterleri.....	6
3. OKRATOKSİN A	9
3.1 Okratoksin A Üreticisi Küfler	11
3.2 Okratoksin A' nın Sağlık Üzerine Etkileri	14
3.3 Gıdalarda Okratoksin A Varlığı	15
3.4 Okratoksin A İle İlgili Yasal Düzenlemeler	18
3.5 Okratoksin A Analiz Yöntemleri	19
4. FUMONİSİN	23
4.1 Fumoisinlerin Sağlık Üzerine Etkileri.....	24
4.2 Fumonisin Üreticisi Küfler.....	25
4.3 Gıdalarda Fumonisin Varlığı.....	27
4.4 Fumonisinler İlgili Yasal Düzenlemeler	32
4.5 Fumonisin Analiz Yöntemleri	34
5. MATERYAL VE METOT	37
5.1 Kırmızı Şarap Örnekleri	37
5.2 Kırmızı Şarap Örneklerinde Mikotoksin Tayini	37
5.2.1 Okratoksin A tayini	37
5.2.1.1 OTA standartlarının hazırlanması	37
5.2.1.2 Geri kazanım değerinin belirlenmesi	39
5.2.1.3 İmmunoaffinite kolonla saflaştırma ile OTA ekstraksiyonu.....	39
5.2.1.4 OTA analizi için HPLC koşulları.....	39
5.2.2 Fumonisin tayini	40
5.2.2.1 Fumonisin B ₁ ve B ₂ standartlarının hazırlanması	40
5.2.2.2 Geri kazanım değerinin belirlenmesi	41
5.2.2.3 İmmunoaffinite kolonla saflaştırma ile fumonisin ekstraksiyonu.....	41
5.2.2.4 Fumonisin B ₁ ve B ₂ analizi için HPLC koşulları	42
6. BULGULAR VE TARTIŞMA	43
6.1 Kırmızı Şarap Örneklerinde Okratoksin A Varlığı	43
6.2 Kırmızı Şarap Örneklerinde Fumonisin B ₂ Varlığı.....	47
7. SONUÇLAR	49

KAYNAKLAR.....	49
EKLER.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	69

KISALTMALAR

a_w	: Su aktivitesi
BEN	: Balkan Endemik Nefropatisi
EC	: Avrupa Birliği Komisyonu
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenlięi Ajansı
ELISA	: Enzim bağlı immün assay
FB₁₋₆	: Fumonisin B ₁₋₆
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPLC-FLD	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-fluoresans dedektör
HPLC-OPA	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ortofital aldehit
IA	: Immunoaffinite
IAK	: Immunoaffinite kolonu
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
LC	: Sıvı kromatografisi
LC-MS	: Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometrisi
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
OPA	: Ortofital aldehit
OTA	: Okratoksin A
PBS	: Phosphate buffer saline
TDI	: Günlük Tolere Edilebilir Limit

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Ülkelerin yıllara göre şarap üretimi (Anon., 2011a)	4
Çizelge 2.2 : Ülkelerin yıllara göre şarap tüketimi (Anon., 2011b)	4
Çizelge 2.3 : Türkiye’de üzüm ekim alanı, üretimi ve kullanımı (DİE, 2013).....	5
Çizelge 3.1 : Okratoksin A’ nın canlılar üzerine etkisi (Gümüş, 2002)	14
Çizelge 3.2 : Hayvan türlerinde uygulama yerine göre LD ₅₀ düzeyleri (Ünal, 2009)15	
Çizelge 3.3 : Gıdalarda okratoksin A varlığı	16
Çizelge 3.4 : Avrupa Birliği Komisyon Direktifleri OTA limitleri (EC, 2006).....	18
Çizelge 4.1 : Gıdalarda fumonisin varlığı.....	30
Çizelge 4.2 : Fumonisin düzeyleri ile ilgili gıdalardaki yasal düzenlemeler.....	33
Çizelge 5.1 : Okratoksin A kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması	38
Çizelge 5.2 : Fumonisin kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması.....	40
Çizelge 6.1 : Kırmızı şarap örneklerinde OTA varlığı.....	43
Çizelge 6.2 : Kırmızı şarap örneklerinde OTA varlığının bölgelere göre dağılımı ...	45

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1 : Okratoksinlerin kimyasal yapısı (Khoury ve Atoui, 2010)	10
Şekil 3.2 : Okratoksin A biyosentezi (Anlı ve Alkıs, 2010).....	11
Şekil 4.1 : Fumonisinin kimyasal yapısı (Waskiewicz ve diğ., 2012).....	24
Şekil 5.1 : Okratoksin A kalibrasyon grafiği	38
Şekil 5.2 : Fumonisin kalibrasyon grafiği	41

KIRMIZI ŞARAPTA OKRATOKSİN A VE FUMONİSİN B₂ VARLIĞININ İNCELENMESİ

ÖZET

Şarap, tarihin en eski dönemlerinden günümüze uzanan üzümdeki şekerin fermentasyonu ile elde edilen alkollü bir içecektir. Tarih boyunca üzümün olduğu her yerde şarap üretilmiştir. Doğru toprak, doğru iklim, doğru üzüm ve doğru üretim basamakları kaliteli son ürünün temelini oluşturur. Şarap yalnızca alkollü bir içki olarak değil, aynı zamanda üzümün değerlendirilmesinde de büyük önem taşır. Büyük bağcı ülkelerin birçoğunda bağ ekonomisinin temeli üzümün şarap olarak değerlendirilmesine dayanır. Şarap üretim tekniklerine göre ve kullanılan üzüm çeşidine bağlı olarak kırmızı, beyaz ve pembe renkli olarak çeşitlilik kazanır. Şarapta kalite kavramı çok önemlidir ve kalite kriterleri duysal, fiziksel-kimyasal ve mikrobiyolojik olmak üzere 3'e ayrılır. Küfler, mikrobiyolojik kalite kriterlerinden biridir.

Okratoksin A (OTA), başlıca *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* ve *Aspergillus section Nigri* üyelerinin büyük bir kısmı tarafından üretilen, toksik özellikte ikincil bir küf metabolitidir. OTA üreticisi küfler, farklı özellikte ve çok sayıda substratta gelişme özelliğine sahip oldukları için meydana gelen kontaminasyonlara bir çok gıdada rastlanılmaktadır. Şarapta ve üzüm suyunda OTA kontaminasyonu ilk olarak 1996 yılında rapor edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar derlendiğinde, genel olarak OTA konsantresi beyaz şaraptan, pembe ve kırmızı şaraba doğru; soğuktan sıcak iklime doğru artmaktadır. Ayrıca tatlılık ve şeker oranı arttıkça OTA artışı olduğu görülmektedir. Ortam koşulları ve şarabın içeriği kontaminasyon için önemli faktörler olsada OTA varlığının ana sebebi toksikojenik küflerden kontamine olmuş üzümlerdir.

Fumonisinler, *Fusarium* spp. tarafından üretilen, genellikle mısır ve mısır ürünlerinde bulunan kontaminantlardır. Genellikle *Fusarium proliferatum* ve *F. verticillioides* tarafından üretilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte *Aspergillus niger*' in fumonisin B₂ (FB₂) ve B₄ (FB₄) üretme kapasitesinde olduğu bildirilmiştir. Üzüm, şıra ve şarapta sıklıkla rastlanan bu küfün FB₂ oluşturma riski yapılan araştırmalarla incelenmektedir.

Deney hayvanlarında gerçekleştirilen araştırmalar ve epidemiyolojik çalışma sonuçları incelendiğinde OTA ve FB₂, Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından potansiyel karsinojen (2B) olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, Marmara, Ege, İç Anadolu, Karadeniz ve Doğu Anadolu olmak üzere Türkiye'nin 5 farklı bölgesinden toplam 51 adet kırmızı şarap temin edilmiştir. Çalışma kapsamında kırmızı şaraplarda OTA ve FB₂ varlığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar AB ülkelerinde ve Türk Gıda Kodeksi (TGK)'nde kabul edilen maksimum limitlere göre değerlendirilmiştir.

Kırmızı şarap örneklerinde OTA ve FB₂ varlığı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile araştırılmıştır. OTA ve FB₂ analizi, hazırlanan örneklerin ekstraksiyonu sonrasında immunoaffinite (IA) kolonla saflaştırılan ekstraktların HPLC yöntemi ile analiziyle gerçekleştirilmiştir. Ters faz kolonda OTA ve FB₂ ayrımı sonrasında floresans dedektörle tespit ve tayin gerçekleştirilmiştir.

Kırmızı şarap örneklerinin 16' sında (%31,4) 0,0903-11,2639 µg/l arasında değişen düzeylerde OTA belirlenmiştir. İç Anadolu Bölgesinden toplanan şarapların 1 tanesinde (%12,5), Ege Bölgesine ait şarapların 2'sinde (%13,3), Karadeniz Bölgesi şaraplarının 2'sinde (%25), Doğu Anadolu Bölgesi şaraplarının ise 3 tanesinde (%37,5) kontaminasyon tespit edilmiştir. Marmara Bölgesinin ise 8 örneğinde (%66,6) OTA kontaminasyonuna rastlanılmıştır. OTA kontaminasyonlarının üzüm ve şaraplarda görülme sıklığı coğrafik farklılıklardan etkilenmektedir. Bölgelere göre yapılan meteorolojik araştırmalar incelendiğinde, yüksek nem miktarı ile OTA kontaminasyonu arasındaki ilişki ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında farklı bölgelerden alınan kırmızı şaraplarda FB₂ kontaminasyonuna rastlanılmamıştır. İnsan sağlığını olumsuz etkileri olan bu mikotoksinin analizlenen şaraplarda bulunmaması tüketici sağlığı açısından olumlu bir sonuçtur.

Şarap yapımı sırasında OTA ve FB₂ oluşumunun önlenmesi amacıyla hammadde kontrolü, bağ alanlarında, hasat sırasında ve sonrasında İyi Tarım Uygulamaları (GAP), İyi Üretim Uygulamaları (GMP) ve İyi Hijyen Uygulamaları (GHP) oldukça önemlidir. Üretim esnasında her bir basamağın titizlikle kontrol edilmesi, son ürünün depolama koşullarının uygun olması, mikotoksin analizlerini düzenli olarak uygun yöntemlerle yapılması kontaminasyonların önlenmesinde etkilidir. Şarapta OTA ve FB₂ oluşumunun önüne geçilmesiyle hem halk sağlığı korunur hem de ekonomik kayıplar önlenmiş olur.

DETERMINATION OF OCHRATOXIN A AND FUMONISIN B₂ IN RED WINES

SUMMARY

Wine is an alcoholic beverage produced by fermentation of grape with a history that spans thousands of years. Celebrated for centuries, wine has extensive historical, cultural and economic significance in the world. Wine has always been produced wherever grape exists. Suitable soil, weather conditions, grape and production steps form the fundamentals of quality. Wine is not only important as an alcoholic beverage but also important in terms of the marketing of grapes for profit. Economy of big wine producer countries rely on this assessment. Wine is categorized as red, white or pink as a result of production techniques or types of grape. Quality concept is very important and quality criteria are categorized as sensory, physical/chemical and microbiological. Fungi is a criterion of microbiological type.

Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite, and it is mainly produced by *Penicillium verrucosum* and several species of *Aspergillus*, including *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius*. These mould species are capable of growing on several substrates under different conditions; hence contamination of OTA in food products could be seen all over the world. OTA is one of the most important mycotoxins of concern for human health. This mycotoxin is a potent nephrotoxin, which also exhibits immunosuppressive, teratogenic and carcinogenic properties. In 1993, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified OTA as a possible human carcinogen (group 2B). Several nephropathies affecting animals as well as humans have been attributed to OTA. In humans, OTA is frequently cited as the possible causative agent of endemic kidney disease observed in the Balkans (Balkan Endemic Nephropathy and related Urinary Tract Tumours).

OTA contamination has been reported in several food commodities, including wine. The occurrence of OTA in wine is related to fungal growth on grapes. Although *Penicillium verrucosum* and *A. ochraceus* are considered to be the main OTA producing species, the *Aspergillus carbonarius* presents a strong evidence of the mainly contribution in the OTA contamination in wine grapes. Several factors, such as climate, grape cultivation, and winemaking techniques affect the presence of OTA in wines. Levels are influenced by climate, which obviously depends on the latitude, but also on the particular circumstances of a given year, such as the temperature and relative humidity in the month before harvest. The geographic region of the origin of wine influences the frequency of occurrence and concentration of OTA in it. In Europe, the OTA content in wine and special wines from southern wine-growing regions is higher than the one from the northern areas.

Fumonisin produced by several *Fusarium* species, especially by *Fusarium verticilloides* and *Fusarium proliferatum*, and natural contaminants of corn and corn products exist all over the world. Fumonisin were first isolated from *F. verticilloides* in 1988 (formerly *F. moniliforme* Sheldon MRC 826) which is isolated from corns consumed in Transkei Region of Southern Africa. Among the fumonisin derivatives, Fumonisin B₁ is the most common one and constitutes about 70–80% of the total fumonisin content of *F. verticilloides* cultures and naturally contaminated foods. Fumonisin B₁ is a kind of fumonisin which is produced by *F. verticilloides* and *F. proliferatum*, fungi that commonly contaminate maize. Fumonisin B₂ accounts for 15–25% of the total fumonisin, while fumonisin B₃ accounts for 3–8%.

Fumonisin have nephrotoxic, hepatotoxic and immunosuppressive effects against various animal species. It has been detected that fumonisin cause leukoencephalomalacia in horses, Porcine Pulmonary Edema and liver cancer in rats. Fumonisin have been classified as a possible human carcinogen (Group 2B) by International Agency for Research on Cancer (IARC) according to findings obtained from test animals.

Fumonisin B₁ is the most commonly found, in corn (maize) and corn-based foods, beer, milk, rice, sorghum, triticale, cowpea seeds, garlic (powder), garlic bulbs, onion powder, black radish, figs, black tea, beans, soybeans and asparagus. Some industrially important strains of *Aspergillus niger* were reported to produce, in addition to ochratoxin A, the mycotoxin fumonisin B₂. It has also been shown that strains of *A. niger* from coffee beans and raisins produced both fumonisin B₂ and fumonisin B₄. *A. niger* is produced fumonisin B₂ from grape. *A. niger* strains isolated from raisins are capable of producing both fumonisin B₂ and fumonisin B₄ when cultured on either grapes or raisins.

In this work 51 types of red wine have been collected from 5 different regions of Turkey (Marmara, Central Anatolia, Aegean, Black Sea, East Anatolia). As part of the study, it was investigated whether OTA and fumonisin B₂ exist in wine, and results were evaluated with respect to Turkish Food Codex and European Union limits.

An analytical method based on immunoaffinity column clean-up and high performance liquid-chromatography with fluorimetric detection was used to determine the occurrence of OTA in red wines. The limit of detection (LOD) was 0,2 µg/l and recovery value was %83,5. In order to minimize public health risk, the European Commission and Turkish Food Codex established a maximum level of 2 µg/l for OTA in wine.

In 16 of the red wine samples (31.4%), OTA was detected between 0,0903-11,2639 µg/l. In one sample From Central Anatolia region (12.5%), 2 samples from Aegean (13.3%), 2 from Black Sea (25%), 3 from East Anatolia (37.5%), contamination was detected. In 8 samples from Marmara (66.6%) OTA contamination were determined. Two samples were detected to have OTA accumulation over the prescribed legal limits in sixteen samples. These samples were from Marmara and the Black Sea Region. The amount of contamination in the sample taken from the Black Sea region was remarkably high. Taking precautions in this region is very significant for public health.

In one sample from Marmara Region, OTA contamination was above the legal limit (2,9414 µg/l). In general, the only one sample in Marmara region, the legal limit exceeded, and OTA contamination was found in many samples.

Existence of OTA contamination in grapes and wine is related to geographic differences. OTA is more frequently detected in red wines than in rose and white wines, suggesting that the reason for the different levels lie in different winemaking techniques. Different climatic conditions, especially humidity and temperature influence the frequency of occurrence and concentration of OTA in wines. Levels are influenced by climate, which obviously depends on the latitude, but also on the particular circumstances of a given year, such as the temperature and relative humidity in the month before harvest. When weather is considered, positive correlation between high moisture and OTA contamination is observed. Grape cultivation, wine making techniques influence the levels of OTA in wines. The higher ratio of sugar, the more contamination is seen.

Recently, , some industrially important strains of *A. niger* were reported to produce, in addition to ochratoxin A, the mycotoxin fumonisin B₂. Fumonisin B₂ has been widely studied as mycotoxin with cancer-promoting activity and are associated with a number of animal and human diseases. Evaluating the potential risk for wine consumers, 51 red wine samples were investigated. Analytical methods such as high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup were used for fumonisin B₂ determination in red wine. The limit of detection (LOD) was 8 µg/l and recovery value was %70,53. Fumonisin B₂ contamination was not observed during the study. Non existence of this hazardous microtoxine is a positive result considering the consumers' health.

Raw material control, good agricultural practices (GAP), good manufacturing practices (GMP), good hygiene practices (GHP) are necessary in vineyards, during harvesting and post harvesting phases , in order to prevent OTA and fumonisin B₂. While producing wine, it is vitally important to prevent contamination in raw material to prevent OTA and fumonisin B₂. Contamination being detected indicates that good agricultural practices haven't been used or contaminated grapes have been used. Good agricultural practices contain setting up vineyards, pruning, soil cultivation, watering, applying hormones, plant protection and harvesting process. Each of these stages should be controlled carefully. As well as controlling raw material, wine and the place where it is kept being under control is significant. Before and while fermentation, ripening and purifying processes, contamination can be kept under control. For preparatory steps for fermentation to be made properly, suitable yeasts must be used to decrease contamination. In vineyards, during harvesting and post harvesting, occurrence of OTA and fumonisin B₂ can be prevented using good manufacturing practices, proper storing conditions and using high quality raw material in wine. During production, every step should be meticulously controlled and storage conditions should be suitable for regular micotoxine analysis work in order to prevent contamination. Preventing OTA and fumonisin B₂ is necessary in terms of protecting health and preventing economic losses.

1. GİRİŞ

Mikotoksinler, küfler tarafından sentezlenen insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olan ikincil metabolitlerdir. Çevre koşulları (nem, oksijen, sıcaklık ve substrat çeşidi) mikotoksin oluşumunu doğrudan etkilemektedir. İnsanlar ve hayvanlar üzerine olan toksik etkiler, mikotoksin dozuna göre değişmektedir. Yüksek dozlar akut toksisiteye veya ölüme neden olurken düşük dozlar bağışıklık sisteminde bozukluklara neden olmaktadır. Çok düşük dozlara uzun süre maruz kalma durumunda tümör oluşumu, kanser ve kronik hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Meerdink, 2002; Siegel ve Babauscio, 2011).

Şarap tarihin en eski günlerinden günümüze kadar uzanan, üzümdeki şekerin fermantasyonu ile elde edilen, dinamik, sürekli değişim halinde olan alkollü bir içecektir. Asmanın olduğu, üzümün üretildiği her yerde şarap üretilmiş ve üretim teknikleri geliştirilmiştir. Şarap, bağdaki üzümde başlayıp doğru üretim tekniklerinin uygulanmasıyla oluşmaktadır. Şarap üretimi üzümün değerlendirilmesinde büyük bir önem taşımaktadır. Büyük bağcı ülkelerin birçoğunda bağ ekonomisinin temeli üzümün şarap olarak değerlendirilmesine dayanmaktadır (Aktan ve Kalkan, 2000). Dünyanın dördüncü büyük bağ alanına sahip olmasına rağmen Türkiye’de şarap üretimi beklenen düzeyde değildir (Er, 2010).

Şarap kullanılan üzüm çeşidine ve uygulanan üretim tekniklerine bağlı olarak kırmızı, beyaz ve pembe renkli olarak gruplandırılır. Üretilmek istenen şarap çeşidine göre farklı üretim proseslerine tabii tutulur. Bu yüzden renk, bileşim ve tat karakterleri açısından şaraplar farklılık göstermektedir. Şarapta kalite kriterleri, duyuşsal, fiziksel-kimyasal ve mikrobiyolojik olmak üzere 3’e ayrılır. Küf varlığı mikrobiyolojik kalite kriterleri içerisinde değerlendirilmektedir.

Okratoksin A (OTA), *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler tarafından üretilen kahve, kakao, çeşitli tahıllar, baharat, yağ, süt ve süt ürünleri, çay, bebek maması,

bira, sirke, üzüm, üzüm suyu ve şarapta yaygın olarak bulunan bir mikotoksindir (Novo ve diğ., 2013; Rhouati ve diğ., 2013).

Okratoksin A, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden bir mikotoksindir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, nefrotoksik, immunosupresif, teratojenik, genotoksik, karsinojenik ve hepatotoksik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Hedef organ böbreklerdir ve karaciğerde kansere sebep olmaktadır (Quintela ve diğ., 2013).

Fumonisinler genel olarak *Fusarium spp.* tarafından üretilen genellikle mısır ve mısır ürünlerinde bulunan mikotoksindir (Smith, 2012). Çoğunlukla *F. verticilloides* ve *F. proliferatum* küfleri tarafından üretilmektedir. Bu türlerin optimum gelişme koşulları birbirleriyle benzerlik göstermektedir.

Fumonisinlerin atlarda kontamine yem tüketimine bağlı olarak beyin hücrelerinde ölüm ve lezyonlara yol açtığı, domuzlarda akciğer ödemlerine, farelerde karaciğer kanserini tetikleyici etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca çeşitli hayvan türlerine karşı karsinojenik, hepatoksik, nefrotoksik ve embriyotoksik etkiler gösterdiği saptanmıştır (Scott, 2012).

Okratoksin A ve fumonisinler Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından 2B sınıfı kanserojen olarak değerlendirilmektedir (IARC, 1993).

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinde üretilmiş kırmızı şarap örneklerinde okratoksin A ve fumonisin B₂ varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. KIRMIZI ŞARAP

2.1 Şarap Tanımı ve Tarihçesi

Şarap; üzümün bir süre kendi halinde bırakılması ile oluşan, insanların yararlandıkları ilk içkilerden biridir (Alkan ve Kalkan, 2000). Eğer şarap üzüm dışında herhangi bir meyveden yapılıyorsa, kullanılan meyvenin ismine göre adlandırılır (TSE, 521). Şarabın tarihi araştırıldığında, milattan önceki devirlere dayandığı görülmektedir (Kennedy, 2007). Hititlerin, Mısırlıların, Asurluların, Fenikelilerin şarap yaptıkları bulunan tarihi yapıtlarla ortaya çıkmaktadır (Estreicher, 2004). Eski Roma ve Yunanlılar'da bağcılık ve şarap kültürü hızlı bir şekilde gelişmiştir. Avrupa' da bu kültürün yayılmasında Romalılar'ın önemli etkisi vardır. Hristiyanlığın yayılmasında da şarabın etkili bir rolü vardır. Ayrıca manastırlarda rahipler, üzüm ıslahında ve işleme tekniklerinin geliştirilmesi etkili olmuşlardır (Aktan ve Kalkan, 2000).

2.2 Şarap Üretimi ve Ekonomik Veriler

İklim şartlarının elverişliliği, üzüm türüne göre seçilen bölge ve toprak yapısının uygunluğu şarap yapımı için çok önemlidir. Üretim için seçilecek yöntem ve uygulanma esnasında gösterilen özen de şarap kalitesini doğrudan etkilemektedir. Şarap üretimi, emek ve çalışma isteyen bir prosestir. Şaraplar temel olarak beyaz, pembe ve kırmızı şarap olarak sınıflandırılır. Ülkelerin yıllara göre şarap üretimi Çizelge 2.1' de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 : Ülkelerin yıllara göre şarap üretimi (Anon., 2011a)

Ülkeler	2007	2008	2009	2010	2010 yılına ait toplam şarap üretimi (%)
Fransa	5,212,700	4,567,200	4,265,400	4,626,900	%16,17
İtalya	4,963,100	4,251,400	4,624,500	4,580,000	%17,53
İspanya	3,829,000	3,640,800	3,591,300	3,609,700	%13,61
ABD	2,510,844	2,431,518	2,785,423	2,653,187	%10,56
Arjantin	1,504,600	1,470,000	1,213,000	1,625,000	%4,60
Avustralya	1,325,000	955,000	1,237,000	1,271,000	%4,44
Almanya	955,000	1,237,000	1,171,000	1,073,000	%3,82
Güney Afrika	851,600	763,300	999,000	922,000	%3,79
Türkiye	25,300	14,000	14,000	14,000	%0,05

Yıllara göre şarap üretimine bakıldığında İtalya ve Fransa’ nın bu alanda birbirlerine çok yakın olduğu görülmektedir. Dünyada üzüm üretiminde önemli bir paya sahip olan Türkiye’ nin ise birçok ülkenin gerisinde kaldığı göze çarpmaktadır. Ülkelerin yıllara göre şarap tüketimi Çizelge 2.2’ de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 : Ülkelerin yıllara göre şarap tüketimi (Anon., 2011b)

Ülkeler	2007	2008	2009	2010	2010 yılına ait toplam şarap tüketimi (%)
ABD	2,752,058	2,761,867	2,762,126	2,912,041	%12,54
Fransa	3,034,900	2,973,300	2,930,400	2,892,000	%12,46
İtalya	2,368,500	2,616,600	2,460,000	2,450,000	%10,54
Almanya	2,013,500	2,013,500	2,025,000	2,020,500	%8,69
İngiltere	1,224,900	1,245,400	1,268,000	1,320,000	%5,68
Rusya	1,113,000	1,168,700	1,145,200	1,150,000	%4,95
İspanya	1,339,100	1,216,800	1,127,100	1,060,000	%4,56
Arjantin	1,116,600	1,067,700	1,034,500	971,400	%4,18
Türkiye	24,000	22,900	22,400	22,400	%0,10

Şarap tüketimine bakıldığında ise ABD ve Fransa’ nın birbirlerine yakın olduğu görülmektedir. Dünyada yaklaşık 7,5 milyon hektar alanda bağcılık yapılmakta ve 65 milyon ton civarında yıllık yaş üzüm üretilmektedir (Akar, 2011). Türkiye’ de üzüm üretimi ve kullanımı Çizelge 2.3’ te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 : Türkiye’de üzüm ekim alanı ve kullanımı (DİE, 2013)

Üzüm			Üzüm		
	Toplam				
	Alan (Dekar)	Üretim (Ton)	Sofralık	Kurutmalık	Şaraplık
1988	5 900 000	3 350 000	-	-	-
1989	5 970 000	3 430 000	-	-	-
1990	5 800 000	3 500 000	-	-	-
1991	5 860 000	3 600 000	-	-	-
1992	5 760 000	3 450 000	-	-	-
1993	5 670 000	3 700 000	-	-	-
1994	5 670 000	3 450 000	-	-	-
1995	5 650 000	3 550 000	-	-	-
1996	5 600 000	3 700 000	-	-	-
1997	5 450 000	3 700 000	-	-	-
1998	5 410 000	3 600 000	-	-	-
1999	5 350 000	3 400 000	-	-	-
2000	5 350 000	3 600 000	-	-	-
2001	5 250 000	3 250 000	-	-	-
2002	5 300 000	3 500 000	-	-	-
2003	5 300 000	3 600 000	-	-	-
2004	5 200 000	3 500 000	1 900 000	1 230 000	370 000
2005	5 160 000	3 850 000	2 000 000	1 400 000	450 000
2006	5 138 351	4 000 063	2 060 167	1 495 697	444 199
2007	4 846 097	3 612 781	1 912 539	1 217 950	482 292
2008	4 827 887	3 918 442	1 970 686	1 477 471	470 285
2009	4 790 239	4 264 720	2 256 845	1 531 987	475 888
2010	4 777 856	4 255 000	2 249 530	1 543 962	461 508
2011	4 725 454	4 296 351	2 268 967	1 562 064	465 320
2012	4 622 959	4 185 126	2 170 634	1 613 833	400 659

Bağcılıkta toprak seçimi, bakım, bölgenin iklim koşulları, budama, sulama, gübreleme, hastalık ve zararlılarla mücadele çok önemlidir. Toprağın yapısı besin maddelerince zengin olmalı ve yeterli miktarda su içermelidir. İklim koşullarının ılıman olması ve üzümün oluşumundan hasadına kadar geçen dönemde iyi koşullara sahip olması kaliteyi artırır. Meyvede istenen şeker-asit oranı, aromatik maddelerin

oluşumu ve şekersiz kuru maddeyi oluşturan elementlerin uyumlu miktarda oluşu iklim koşullarından büyük ölçüde etkilenir. Yapılacak şarabın türüne göre en ideal asit-şeker oranı yakalandığında hasada başlanmalıdır. Kaliteli şarap üretimi için hastalıksız üzümler kullanılmalıdır (Aktan ve Kalkan, 2000).

2.3 Kırmızı Şarap Üretimi ve Şarapta Kalite Kriterleri

Kırmızı şarap yapımında tarlada hasat işleminden sonra üretim alanına getirilen siyah üzümler seçilerek çöp ayırma işlemi dikkatli bir şekilde yapılır. Çöpleri ayrılan üzümler ezildikten sonra fermentasyona bırakılır. Üzümlerin kabuk ve çekirdekleri ile bekletilerek renk, tanen ve diğer organik maddelerin şaraba kazandırıldığı işleme maserasyon denilir. Üretilcek şarabın özelliklerine göre maserasyon süresi ayarlanarak bu işlem sonunda şıra fermentasyon tanklarına gönderilir. Fermentasyon tanklarında sıcaklık kontrolü maya aktivasyonunun kontrolü için önemlidir. Fermentasyon sonunda şaraplar hem tat özellikleri hem de bulanıklık nedeniyle dinlendirilmeye bırakılır. Tadın olgunlaştırılması, şarabın bulanıklığının giderilip durulması için dinlendirilmesi, dinlendirme esnasında aktarmalar yapılması ve aynı zamanda kükürtlenmesi gerekmektedir. Dinlendirme süresi şarap çeşidine göre değişmektedir. Dinlenme sırasında ölü mayaların bozularak şaraba kötü bir tat ve koku vermesini engellemek için şaraptan uzaklaştırılması gerekmektedir. Aktarma işlemi ile çöken maya ve tortular uzaklaştırılırken, şarabın hava alması da sağlanmış olur. Böylece olgunlaşma daha hızlı bir şekilde gerçekleşir. Olgunlaştırma işlemi boyunca şarapta berraklaşma başlar ancak bu berraklık devamlı ve yeterli olmadığı için şarap donuk ve puslu kalır. Bu nedenle berraklaştırma işlemi yapılmaktadır. Böylece şaraplar berrak ve parlak hale gelirken mikrobiyal yük de önemli ölçüde azalmaktadır. Şaraplar olgunlaştırıldıktan ve berraklaştırıldıktan sonra dolum prosesine geçilir ve bu prosesten sonra piyasaya verilmek üzere hazır hale gelir. (Aktan ve Kalkan, 2000).

Şarapta kalite kavramı çok önemlidir ve kalite kriterleri duyuşal, fiziksel-kimyasal ve mikrobiyolojik olmak üzere 3'e ayrılır. Duyuşal kalite kriterlerini renk, berraklık, koku, tat ve dolgunluk etkilemektedir. Fiziksel ve kimyasal kalite kriterlerini alkol yüzdesi, alkol derecesi, toplam asidite, sabit asidite, uçar asidite oranları, toplam ve serbest kükürtdioksit miktarı, indirgen şekerler ve sakkaroz miktarı, kül miktarı ve

baziklığı, yoğunluk, ağır metal ve yabancı madde miktarı oluşturmaktadır. Bu değerlerin kabul edilebilir miktarlardan fazla olması kaliteyi önemli ölçüde etkiler. Küfler, mayalar ve bakteriler ise mikrobiyolojik kalite kriterlerini oluşturmaktadır (Aktan ve Kalkan, 2000). Okratoksin A, şarap kalitesini doğrudan etkileyen küfler tarafından sentezlenen mikotoksinlerdendir. İnsan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara yol açması sebebiyle uluslararası komisyonlarca gıdalarda kabul edilebilir düzeyleri belirlenmiştir (Makun ve diğ., 2013). Fumonisinler, Okratoksin A gibi küfler tarafından sentezlenen mikotoksinlerdir. Şarap kalitesini etkilediği son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Fumosinlerin de çeşitli hastalıklara neden olmasından dolayı uluslararası komisyonlarca gıdalarda kabul edilebilir düzeyleri belirlenmiştir (Logrieco ve diğ., 2009). Şarap için herhangi bir limit değer henüz bulunmamaktadır. Üzüm bağından başlanarak İyi Tarım ve İyi Üretim Uygulamalarının benimsenmesi, şarap üretimi sırasında kontaminasyon miktarını azaltacak önlemlerin alınması, her aşamada hijyen kurallarına uyulması kaliteli ve sağlıklı şarap eldesi açısından çok önemlidir.

3. OKRATOKSİN A

Okratoksin A (OTA), *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler tarafından üretilen kahve, kakao, çeşitli tahıllar, baharat, yağ, süt ve süt ürünleri, çay, bebek maması, bira, sirke, üzüm suyu ve şarapta yaygın olarak bulunan bir mikotoksindir (Novo ve diğ., 2013; Rhouati ve diğ., 2013). Gıdalarda OTA kontaminasyonunu, çevresel faktörlerden sıcaklık, nem ve depolama koşulları doğrudan etkiler (Anlı ve Alkış, 2010).

OTA, renksiz, suda az ancak sulu sodyum bikarbonatlı çözeltilerde iyi çözünen, zayıf organik asit gibi davranan, kristal toz halinde bir bileşiktir. Isıya karşı oldukça dirençlidir. Işık ve havaya dayanıklı olmayıp, nemli ve güneş ışığı gibi koşullara maruz kaldığı zaman bozulabilir. Kristal formda ultraviyole (UV) ışık altında, asit solüsyonda yeşil, alkalik solüsyonda ise mavi floresans verir. Kristal formların erime noktası 169°C' dir. OTA, okratoksinler arasında en toksik özellikte olanıdır. Okratoksin B (OTB), OTA' dan daha az toksiktir (Ünal, 2009).

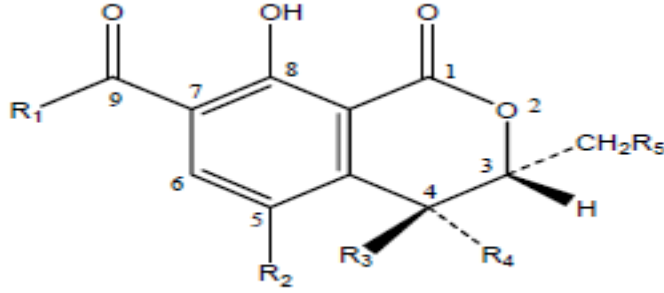
OTA, 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi 3,4-dihidro-3-metil isokumarin yapısını içerir (Novo ve diğ., 2013). Şekil 3.1' de okratoksinlerin kimyasal yapısı gösterilmiştir (Khoury ve Atoui, 2010).

Okratoksinin ilgili metabolitleri ve kimyasal yapısı şekilde ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Şekil 3.1' de görüldüğü gibi OTA 12-karboksi grubundan L-fenilalanine bağlanmış bir pentaketit türevi hidroksikumarin yapısındadır. Moleküler ağırlığı 403.82 g mol⁻¹' dür. Okratoksin A' nın yanı sıra Okratoksin B (OTB), Okratoksin C (OTC) ve bunların metil esterleri de mikotoksinler arasında yer alır (Khoury ve Atoui, 2010).

OTA' nın biyosentezi birçok basamaktan oluşmakla beraber, enerji ve Mg⁺⁺ bileşiğine sentez sırasında ihtiyaç duyulmaktadır (Ünal 2009). Şekil 3.2' de OTA' nın biyosentezi ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

İzokumarin türevleri olan okratoksinler, L-β fenilalanine amid bağı ile bağlı, biyosentetik orijinine göre poliketidler grubu içinde pentaketitler olarak

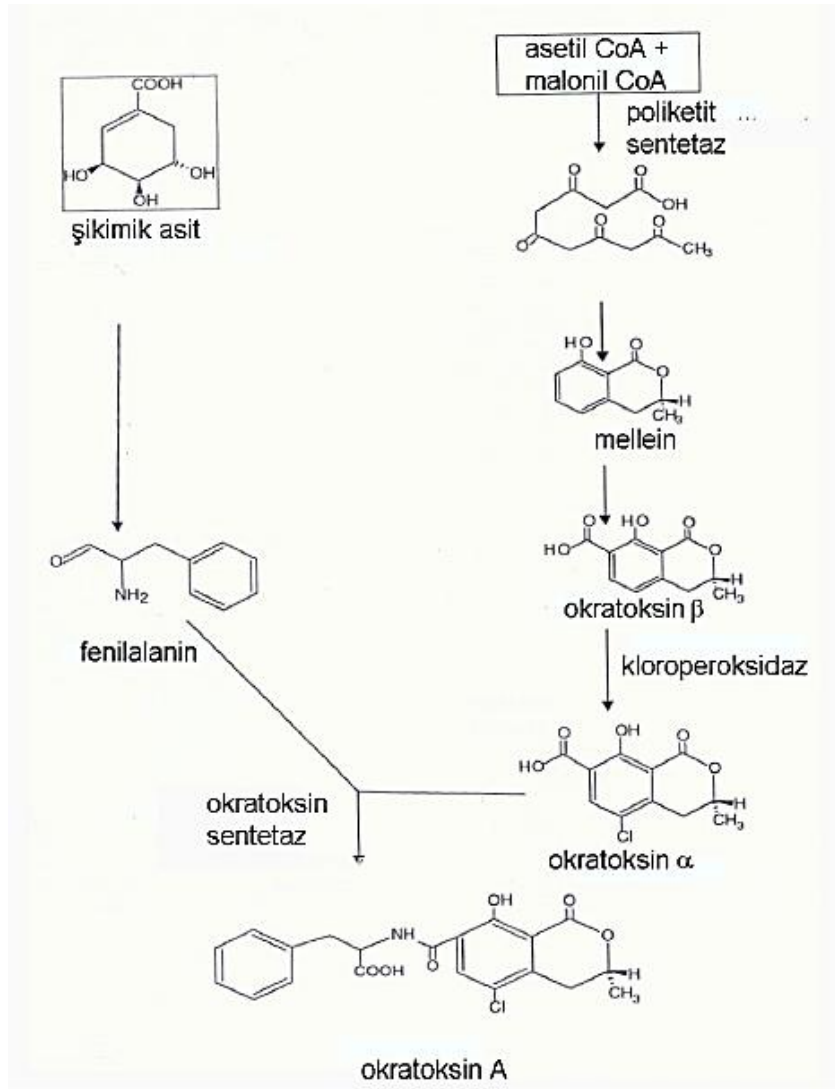
sınıflandırılmış bileşiklerdir. Pentaketitler, asetil ve malonil CoA'dan oluşurlar ve sikülizasyon ve aromatisasyon ile pentaketitler izokumarine dönüşür. Karboksitürevinin oksidasyon, klorinasyon, metilasyon ve asit aktivasyonları ile şikimik asit yolu sonrası oluşan fenilalanin ve fosfookratoksin A, OTA'yı oluşturmaktadır.



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
Fenilalanil	Cl	H	H	H	Okratoksin A
Fenilalanil	H	H	H	H	Okratoksin B
Fenilalanil etil ester	Cl	H	H	H	Okratoksin C
Fenilalanil metil ester	Cl	H	H	H	Okratoksin A metil ester
Fenilalanil metil ester	H	H	H	H	Okratoksin B metil ester
Fenilalanil etil ester	H	H	H	H	Okratoksin B etil ester
OH	Cl	H	H	H	Okratoksin α
OH	H	H	H	H	Okratoksin β
Fenilalanil	Cl	H	OH	H	4R- Hidroksiokratoksin A
Fenilalanil	Cl	OH	H	H	4S- Hidroksiokratoksin A
Fenilalanil	Cl	H	H	OH	10- Hidroksiokratoksin A

Şekil 3.1 : Okratoksinlerin kimyasal yapısı (Khoury ve Atoui, 2010)

Kloroperoksidaz enziminin aktivitesi ile klorinasyon işlemi gerçekleşmektedir. Kloroperoksidaz düşük substrat spesifitesi gösteren, hayvan ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan, biyosentezi başlatan enzimdir. OTA biyosentezinde ana kısımlar olan fosfookratoksin a ve fenilalanin etil esteri oluşumunu, bunların birleşme reaksiyonları takip eder. Birleşme, okratoksin sentetaz kompleksi ile olur. Bu sırada ATP ve Mg⁺⁺ reaksiyon için gereklidir (Ünal, 2009)



Şekil 3.2 : Okratoksin A biyosentezi (Anlı ve Alkıs, 2010)

3.1 Okratoksin A Üreticisi Küfler

Okratoksin A, temel olarak *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilmektedir. *Aspergillus carbonarius* ve *Aspergillus niger* OTA üreten başlıca küflerdendir. Son yıllarda bildirilen, *Aspergillus westerdijkiae* ve *Aspergillus steynii*, *Circumdati* türüne ait, iki yeni türdür. En etkili OTA üreticisi küf olarak bilinen *A. ochraceus*'tan ayrılmış ve daha güçlü oldukları bildirilmiştir. Bu türlerin arasında *A. carbonarius* en yüksek okratoksijenik potansiyele sahip olanıdır (Hayat ve diğ., 2012). *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sulphureus* okratoksin kontaminasyonlarında etkilidirler (Anlı ve Alkıs, 2010; Copetti ve diğ., 2013).

A. ochraceus, *A. westerdijkiae* ve *A. steynii*, gıdalarda 8-40°C (optimum 24-31°C) arasında, 0,95- 0,99 su aktivitesinde, 3-10 pH arasında gelişim gösterir. *A. ochraceus*

kuru meyveler, fındık, baharat, kahve ve kahve çekirdeğinde yaygın olarak bulunmaktadır (Duarte ve diğ., 2010).

A. niger, ılıman bölgelerde tarlalarda, tropik ve sıcak bölgelerde depolarda yaygın olarak bulunmaktadır. Tahıllarda, yağlı tohumlarda ve karma yemlerde OTA kontaminasyonuna neden olmaktadır (Anlı ve Akış, 2010). *A. niger* üzüm, şarap ve kahve çekirdeklerinde *A. carbonarius*'dan sonra ikinci önemli OTA üreticisi kültür (Frisvad ve diğ., 2007). *A. niger*, minumum 6-8°C, maksimum 45-47°C ve optimum 35- 37°C'de gelişmektedir. Bu değerler izolat, substrat ve coğrafi koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Kserofilik bir küf olan *A. niger*, 0,77 su aktivitesi ve 35°C'de gelişmektedir (Duarte ve diğ., 2010). *A. niger*' in OTA üretiminde, gelişme koşullarında olduğu gibi birçok faktör etkilidir ancak OTA oluşumu için gerekli koşullar küf gelişimine göre daha dar sınırlardadır. Suşların OTA üretim potansiyeli birbirinden farklılık göstermektedir (Astoreca ve diğ.,2009). Sıcaklıkta meydana gelen değişimler, kuraklık sonucu oluşan stres, substratın bileşimi toksin oluşumunda önemli faktörlerdir (Ilic ve diğ., 2007). Üzüm ve üzüm ürünlerinde üzümün yetiştiği bölge, yıl ve gelişme dönemi *A. niger*'in okratoksin oluşturma kapasitesini etkilemektedir (Belli ve diğ., 2005). Fransa'da farklı iklim özelliklerine sahip dört farklı bağda şarap yapımında kullanılan üzümlerin mikroflorası ve oluşabilecek OTA kontaminasyonu araştırılmıştır. Sıcaklığın en yüksek olduğu yıllarda *A. niger*' in daha baskın olduğu belirtilmiş ancak OTA üretimi açısından yıllar arasındaki farklılığının önemli olmadığı ve *A. niger* izolatlarının bu üzümlerde *A. carbonarius*' dan sonra ikinci önemli küf olduğu belirtilmiştir (Bejaoui ve diğ., 2006).

A. carbonarius' un gelişiminde, substratın su aktivitesi ve sıcaklık önemli çevresel etkenlerdir. Güneş ışınlarına karşı dirençli olan *A. carbonarius*, *A. niger*' e göre daha düşük sıcaklarda gelişmektedir. Yüksek a_w (0,95-0,98) ve sıcaklıkta (32-35°C) küf sayısı artış göstermektedir.

Üzümlerde ve üzüm suyu, kuru üzüm ve bağcılık ürünleri olan üzüm kaynaklı yiyeceklerde OTA üreten başlıca küf grubu siyah aspergilli' dir. Üzüm zararının zarar görmesi, üzüm salkımlarında siyah aspergilli kontaminasyonuna ve diğer küflerin oluşumuna neden olmaktadır (Jiang ve diğ., 2013). Bunun yanında fungal gelişme, gözlenebilir semptomlar olmadan da oluşabilmektedir (Arribas ve Polo, 2009). Üzümlerde okratoksin gelişimini sıcaklık, yağış ve bağıl nem doğrudan

etkilemektedir. Yüksek sıcaklığın ve a_w 'nin etkisi, bağıl nemin ve yağmurun etkisine göre daha fazladır (Anlı ve Alkış, 2010). *A. carbonarius*' un üzüm ve şarapta özellikle Akdeniz bölgesine ait olanlarda, kahve ve kakaoda OTA birikimden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Hayat ve diğ., 2012). İtalya'da yapılan bir çalışmada, üzümlerden izole edilen küflerden *A. tubingensis*'in, *A. carbonarius* ve *A. niger* ile birlikte, OTA üretme yeteneğine sahip olduğu ve İtalyan şaraplarında meydana gelen kontamisyondan sorumlu olduğu belirtilmektedir (Perrone ve diğ., 2005). Üzümden elde edilen *A. carbonarius* izolatlarının gelişme hızlarının su aktivitesi değerine bağlı olarak artış gösterdiği ve 25°C sıcaklıkta, yüksek a_w değerinde (0,95-0,995) en yüksek; düşük a_w değerinde (0,90) ise minimum gelişme gösterdiği bildirilmiştir. Üzümlle ilgili yapılan bir başka çalışmada *A. carbonarius* 'un optimum sıcaklıkta iken düşük su aktivitesine daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Belli ve diğ., 2004; Amezquata ve diğ., 2008). Bölgesel ve suşlar arası farklılıklar *A. carbonarius* suşlarının optimum gelişme sıcaklığı ve su aktivite değerleri üzerinde etkili olmaktadır. İtalya, Fransa, Portekiz ve İspanya' da şaraplık üzümlerden izole edilen *A. carbonarius* suşlarının 30°C' de 0,95-0,995 a_w değerinde en yüksek gelişme gösterdiği, Arjantin' de kuru üzümde izole edilen suşların ise 30°C' de 0,95 a_w değerinde en yüksek gelişme gösterdiği bildirilmiştir (Romero ve diğ., 2007). Gelişim üzerine etkili olan çevresel faktörler OTA üretimi için de önemli olmaktadır. Avrupa'nın farklı bölgelerinden toplanan şaraplık üzümlerden elde edilen *A. carbonarius* izolatlarının, optimum 20°C' de ve yüksek a_w değerlerinde OTA ürettiği bildirilmiştir (Belli ve diğ., 2005). *A. carbonarius* suşlarının kuru üzümde yüksek miktarda OTA üretme kapasitesine sahip olduğu yapılan birçok çalışma ile doğrulanmıştır. Arjantin'de marketlerden toplanan kuru üzümlerden izole edilen *Aspergillus section Nigri* grubuna ait 219 suştan 62 tanesinin OTA üretme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Okratoksijenik suşların %82,6' sını *A. carbonarius* izolatlarının oluşturduğu ifade edilmiştir (Magnoli ve diğ., 2004).

Aspergilli türü ılık bölgeleri tercih ederken, *Penicillim* türleri düşük sıcaklıklarda daha iyi gelişebilmektedir. *Penicillium nordicum* ve *Penicillium verrucosum* OTA üreticisi olarak bilinir ve genellikle tahıl ürünleri, et ürünleri ve peynirde kontaminasyonlara neden olmaktadır (Hayat ve ark., 2012).

3.2 Okratoksin A' nın Sağlık Üzerine Etkileri

Okratoksin A, insan sağlığını tehdit eden bir miktoksindir. Okratoksin A, nefrotoksik (ürogenital sisteme zarar veren), immunosupresif (immune sisteme etki eden toksik), teratojenik (anormal oluşumların sebebi), genotoksik (genom üzerine etki eden), karsinojenik (kanserojen) ve hepatotoksik özellik göstermektedir. Hedef organ böbreklerdir ve karaciğerde kansere sebep olmaktadır (Quintela ve diğ., 2013). OTA' nın toksik etkisi, maruz kalma süresine ve miktarına bağlıdır. Maruz kalınması durumunda zarar gören ilk organ böbreklerdir. İnsanlarda OTA, Balkan Endemik Nefropati (BEN) hastalığına yol açmaktadır. Bu hastalığa özellikle Balkanlarda çok rastlanılmaktadır (EFSA, 2006). 35-55 yaş grubu arasında bulunan kadınlarda iştahsızlık, zayıflık, belde kronik ağrılarla beraber böbrek fonksiyon bozukluğu ve proteinür en çok rastlanan semptomlardır (Ünal, 2009). OTA' nın hayvanlar üzerindeki etkileri göz önüne alınarak insanlar için muhtemel kanserojen gruba dahil edilmiştir (grup 2B) (IARC, 1993).

Karmaşık bir etki mekanizmasına sahip olan OTA, organizmanın protein sentezini, mitokondriyal iletim sistemini ve glukoneojenazı inhibe eder. Bunun sonucunda kanın pıhtılaşma mekanizmasını bozulmaktadır. Teratojenik özelliği sebebiyle bağışıklık sistemini baskılamakta ve sekonder enfeksiyon (*E.coli*) olasılığını arttırmaktadır. Bunlara ek olarak vücuttaki yağ peroksidasyonu OTA aktivitesi ile artış göstermektedir. Protein ve RNA sentezinde etkili olmadığı halde hızlı ve seçici bir protein inhibitörü olduğu kanıtlanmıştır (Gümü, 2002).

OTA' nın canlılar üzerindeki etkileri Çizelge 3.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 : Okratoksin A' nın canlılar üzerine etkisi (Gümü, 2002)

Etki Çeşitleri	Belirtiler
Biyokimyasal etkiler	Hepatik glukojen düzeyinde azalma
Biyolojik etkiler	Deney hayvanlarında tümör oluşumu
Teratojenite	Protein sentezinin inhibisyonu Canlılarda ölü ve sakat doğumlar
Nefrotoksisite	Akut olarak böbreklerde hasar, tümör oluşumu, nefropati ve böbreklerde ani kanama Böbreklerin proksimal tüplerine etki, şişme, genişleme ve membran kalınlaşması
Hepatotoksisite	Karaciğer hasarında artış

OTA fareler ve sıçanlarda böbrek ve ciğerlerde tümörlere sebep olmaktadır (Ringot, 2005). OTA' nın LD₅₀ değeri ve yarılanma ömrü, her tür arasında değişiklik gösterir. Farelerde 48-50 mg kg⁻¹ v.a. (vücut ağırlığı), sıçanlarda 20-30 mg kg⁻¹ v.a., domuz, tavşan, kedi ve köpeklerde ise 0.2-0.1 mg kg⁻¹ v.a.' dır (O'Brien ve Dietrich, 2005).

Çizelge 3.2' de toksinin oral, periton içi, damar içi veriliş şekillerine göre LD₅₀ değerleri gösterilmiştir. Akut toksisiteye duyarlılıkları saptanarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2 : Hayvan türlerinde uygulama yerine göre LD₅₀ düzeyleri (Ünal, 2009)

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	-	-

Hayvan yemlerinde kritik konsantrasyon olan 200 µg/kg limiti aşıldığında, hayvansal ürünlerde OTA varlığı tespit edilmiştir. OTA, hayvanlar için kuvvetli bir nefrotoksindir. İnek ve koyun gibi geviş getiren hayvanlarda ise OTA kana absorbe olmadan, midelerinde bulunan protozoalarca üretilen non-toksik metabolitlerce hidroliz edilmektedir (Arribas ve Polo, 2009).

3.3 Gıdalarda Okratoksin A Varlığı

Gıdalarda OTA kontaminasyonu ilk kez 1969 yılında mısırdaki belirlenmiştir (Shotwell ve diğ., 1969). Çok sayıda küfün OTA üreticisi olmasından dolayı farklı ürünlerde kontaminasyonlar saptanmıştır. Çizelge 3.3' te OTA varlığının belirlendiği gıdalar gösterilmiştir. OTA oluşumuna neden olan küf türü bölgeye ve ürüne göre değişiklik göstermektedir. OTA varlığına hayvansal ürünlerde de rastlanması, yemlerdeki OTA kontaminasyonundan kaynaklanmaktadır (EFSA, 2006).

Çizelge 3.3 : Gıdalarda okratoksin A varlığı

Gıda Örneği	Ülke	Yöntem	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı	Aralık Değer ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referans
Kahvaltılık gevrek Tahıl-bazlı gıdalar Tarhana	Türkiye	HPLC	37	31	0,32	Ozden ve diğ., 2012
			21	27	0,14	
			84	79	0,41	
Mısır Buğday Pirinç Arpma	İspanya	HPLC	21	1	0,10	Ibáñez-Vea ve diğ., 2012
			14	9	0,43	
			8	7	0,16	
			123	71	0,10	
Buğday Yulaf	İspanya	HPLC	37	11	1,1	Vidal ve diğ., 2013
			30	6	0,3	
Pirinç Mısır Darı Millet Yer fıstığı	Nijerya	LC	22	1	0,1	Toffa ve diğ., 2013
			39	-	-	
			6	-	-	
			7	-	-	
			7	6	3,7	
Mısır Millet Guinea mısırı Acha Susam Cassava	Nijerya	HPLC	17	16	0-139,2	Makun ve diğ., 2013
			18	18	10,20-46,57	
			17	16	0-29,50	
			20	20	1,38-23,90	
			19	19	1,90-15,66	
			18	18	3,28-22,73	
Bira	Türkiye	HPLC	69	69	0,008-0,488	Anlı ve Alkış, 2010
Peynir Peynir içi	İtalya	HPLC	32	6	1-262	Pattano ve diğ., 2013
			32	6	18,4-146	
Kakao kabuğu Kakao yağı Kek Kakao tozu	Brezilya	HPLC	19	19	0,13-2,01	Copetti ve diğ., 2013
			25	20	<LOD-0,06	
			26	26	0,03-3,18	
			16	16	0,05-5,13	
Kahve; Yeşil Kavrulmuş Çözülebilir	Arjantin	HPLC	5	5	5,77	Vanesa ve Ana, 2013
			24	13	1,00	
			22	17	1,99	
Kahve ve ürünleri	İtalya	HPLC	50	48	0,32-6,49	Vecchio ve diğ., 2012
Pul biber Kırmızıbiber Karabiber Kimyon Tarçın	Türkiye	HPLC	24	18	16,44	Ozbey ve Kabak, 2012
			22	12	24,65	
			23	4	1,82	
			19	1	0,63	
			17	0	<LOD	

Çizelge 3.3 : Gıdalarda okratoksin A varlığı (devamı)

Çili sosu Öğütülmüş çili Çili tozu	Pakistan	HPLC	50 57 63	17 34 36	LOD-54,5 LOD-94,1 LOD-104,4	Iqbal ve diğ., 2013
Bebek mamaları	Türkiye	HPLC	62	12	0,017-0,184	Kabak,2012
Bebek mamaları	Türkiye	HPLC	27	10	0,034-0,21	Egmand ve diğ., 2008
Kuru incir	Türkiye	HPLC	115	55	0,12-15,31	Heperkan ve Güler, 2008
Jambon İç yüzey Dış yüzey	İtalya	HPLC	110	32 84	0,24 0,98	Dall'Asta ve diğ., 2010
Çekirdeksiz kuru üzüm	Türkiye	HPLC	40	26	0,38-20,90	Çelik, 2008
Yaş üzüm Kuru üzüm	Türkiye	HPLC	22 22	21 22	0,2-0,7 5,1-18,2	Var ve Kabak, 2008
Üzüm püresi Şarap posası	İspanya	HPLC	100 100	86 88	34,2-456,8 48,3-602,5	Solfrizzo ve diğ., 2008
Yaş üzüm	Türkiye	HPLC	52	15	0,24-1,5	Var ve Kabak, 2006
Üzüm Şırası	İtalya	HPLC	15	1	2,5	Anfossi ve diğ.,2012
Üzüm Şırası Kırmızı Beyaz	Türkiye	HPLC	28 18	28 18	0,27 0,13	Anlı ve diğ., 2011
Kırmızı şarap	İspanya	HPLC	51	51	0,00049-0,142	Remiro ve diğ.,2012
Kırmızı şarap	İspanya	HPLC	30	26	0,026-0,144	Quintela ve diğ., 2012
Şarap	Çek	UPLC	26	5	0,0012-0,0712	Mikulikova ve diğ., 2012
Kırmızı Beyaz şarap	İtalya	HPLC	22 9	4 3	0,0018-0,0046 0,0016-0,0028	Anfossi ve diğ.,2012
Kırmızı Beyaz şarap	Şili	HPLC	867 321	30 5	0,35 0,14	Vega ve diğ., 2012
Pembe Kırmızı Beyaz şarap	İtalya	HPLC	3 94 3	1 54 2	0,007 0,022-0,048 0,014	Quintela ve diğ., 2011
Beyaz şarap Kırmızı	İtalya	HPLC	204 1002	125 695	0,086 0,121	Spadaro ve diğ., 2010
Kırmızı şarap	Çin	HPLC	28	28	0,0028-0,0437	Mao ve diğ., 2013
Kırmızı şarap	İspanya	HPLC	96	95	<LOD-0,455	Remiro ve diğ., 2012

Şarapta ve üzüm suyunda OTA kontaminasyonu ilk olarak 1996 yılında rapor edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar derlendiğinde, genel olarak OTA konsantrasyonu beyaz şaraptan, pembe ve kırmızı şaraba doğru; soğuktan sıcak iklime doğru artmaktadır. Ayrıca tatlılık ve şeker oranı arttıkça OTA artışı olduğu görülmektedir. Ortam koşulları ve şarabın içeriği kontaminasyon için önemli faktörler olsada OTA varlığının ana sebebi toksikojenik küflerden kontamine olmuş üzümlerdir (Mikulikova ve diğ., 2012; Remiro ve diğ., 2012).

3.4 Okratoksin A İle İlgili Yasal Düzenlemeler

Mikotoksinlerin insan sağlığına olan olumsuz etkilerinden korunmak amacıyla gıdalarda bulunabilecek OTA miktarı ile ilgili yasal düzenlemeler mevcuttur. Avrupa Birliği' nin Komisyon Direktifi'nde insanların yiyeceklerle aldıkları OTA miktarları üzerine yapılan çalışmada bulaşma oranları; tahıl ve tahıl ürünlerinden % 50, şaraptan %13, kahveden %10, baharattan %8, biradan %5, kakaodan %4, kuru meyveden %3 ve kümes hayvanlarının etinden %1' dir (EC, 2002). Avrupa Birliği ve ülkemizde kahve, tahıl ve tahıl ürünleri, kuru üzümler, şarap ve bebek mamalarında OTA ile ilgili yasal düzenlemeler yapılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 : Avrupa Birliği Komisyon Direktifleri OTA limitleri (EC, 2006)

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)
OKRATOKSİN A	
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

Çizelge 3.4 : Avrupa Birliği Komisyon Direktifleri OTA limitleri (EC, 2006)
(devamı)

Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,5
Baharatlar	15-30
Meyan kökü, bitki özü içerikli infüzyon gıdalar	20
Şekerleme ve içeceklerde kullanılan meyan kökü ekstraktı	80

Türkiye’de 1997 yılında yürürlüğe giren, “Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Belirlenmesi Hakkında Tebliğ” ile Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’nde OTA için maksimum seviyeler, Avrupa Birliği Komisyon Direktifleri ile aynıdır. Yalnızca baharatlar, meyan kökü ve meyan kökü ekstraktı için ayrı bir düzenleme yapılmamış bunun yerine diğer gıda maddeleri olarak belirtilip limit değer 10 µg/kg olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.4’ te bebek ve küçük çocuk ek gıdalarında kabul edilebilir OTA seviyesinin en düşük miktarda olduğu görülmektedir, Bebek ve küçük çocukların hassas tüketici grubunda olmasından dolayı OTA limiti olabildiğince düşük tutulmalıdır,

3.5 Okratoksin A Analiz Yöntemleri

Gıdalarda ve yemlerde OTA analizi ve varlığının doğrulanması için çok çeşitli yöntemler mevcuttur. tercih edilen yöntemler ince tabaka kromatografisi (TLC), floresans dedektörlü yüksek sıvı kromatografisi (HPLC), immunokimyasal yöntem (ELISA) ve kütle spektroskopisi (MS)’ dir (Meulenberg, 2012). Analiz yöntemleri uygulanmadan önce örnekler uygun yöntemlerle hazırlanmalıdır.

Örnek hazırlanmasında ilk aşama, sıvı veya katı örneğin, analizi gerçekleştirecek bileşikleri çözen bir çözgen ile ekstraksiyon aşamasını içerir (Hışıl, 1994). Ekstraksiyon sırasında OTA’ nın analizi için genellikle asit içeren solvent ya da sulu sodyum bikarbonat çözeltisi içeren ekstraksiyon solventi kullanılır ve bu işlem yüksek hızda çalışan bir karıştırıcıda veya blenderda gerçekleştirilir. Şarap, bira, süt gibi sıvı gıdalar susuz organik solventlerle ekstrakte edilirken, katı gıdaların ekstraksiyonu sırasında çeşitli solvent karışımları kullanılır. Ekstraksiyonun protein yapılı matrislerden tam olarak yapılabilmesi için güçlü asidik koşullara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden bu ürünlerde santrifüj işlemine başvurulur (Scott, 2002).

Temizleme işlemi ekstraksiyon aşamasından sonra uygulanmaktadır. Ekstraksiyon sonrasında, mikotoksinle beraber bir çok madde gelmektedir. Analizi istenen bileşiklerin dışında gelen bu kirletici bileşiklerin uzaklaştırılması, doğru sonuçların elde edilmesi için önemlidir (Hışıl, 1994). OTA analizi için geliştirilen tüm metotlar temizleme aşamasını içermemektedirler. ELISA yönteminde temizleme işlemi yapılmamaktadır (Scott, 2002). Örnekler hazırlandıktan sonra ayırma, tespit etme ve belirlemeye geçilmektedir.

TLC, mikotoksin analizleri için en çok kullanılan kalitatif ve kantitatif tayini tekniğidir. Bu uygulamanın en büyük avantajı maliyetinin düşük olmasıdır (Turner ve diğ., 2009). TLC yönteminde OTA, örneklerden asit ortamda kloroform ile ekstrakte edildikten sonra, özel kolonlarda temizlenip UV lamba altında tayin edilmektedir (WHO, 2008) .

HPLC, düşük moleköl ağırlığına sahip bileşiklerin analizinde ve mikotoksinlerin analizinde kullanılmaktadır (Var ve diğ., 2004). Gelişmiş kromatografik tekniklerden biri olup, en büyük avantajı ısıya dayanıklı olmayan ve uçucu olmayan bileşiklerin analizini gerçekleştirebilmesidir (Hışıl, 1994). Genel olarak bu yöntemde, floresans dedektörlü ters faz kullanılır. Türevlendirme yapılmaksızın tayin edilebilmektedir, çünkü OTA doğal floresans veren bir maddedir. C-18 kolonlar ve asetik asitli asetonitril su karışımı mobil faz analiz sırasında tercih edilmektedir. Örneklerin ekstraksiyonu aşamasında genellikle, yüksek performans gösteren, hassasiyet ve doğruluk sağlayan immunoaffinite kolon kullanılmaktadır (Turner ve diğ., 2009).

ELISA yöntemi, basit olması ve kısa sürede bir çok örneğe uygulanabildiği için OTA' nın belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde çok fazla solventle çalışılmaması önemli bir avantajıdır (Ünal, 2009). Arpa, diğer tahıllar, yem, hayvan dokusu ve serum analizi için ELISA metodu kullanılmaktadır (Hışıl, 1994). ELISA yöntemi, antijen-antikor reaksiyonuna dayanır. Katı yüzeyler üzerine bağlanmış antikor ile örnekteki OTA ve OTA ile işaretlenmiş enzim arasında reaksiyonlar yöntemin esasıdır. Antikor ile örnek ve OTA ile işaretlenmiş enzimin inkübasyonundan sonra yıkama yapılır. Yıkama sonrasında bağlanmamış enzim, uygun bir substrat ile reaksiyona sokularak meydana gelen rengin şiddetinden OTA konsantrasyonu hesaplanır (Ünal, 2009).

OTA varlığının doğrulanması amacıyla sıvı kromatografi (LC)- kütle spektrometrisi (MS) LC_MS/MS, gaz kromatografisi (GC)- MS kullanılmaktadır. MS yöntemi ile ayırma ve belirleme oranı artmaktadır. Ancak yüksek ekipman maliyeti ve tecrübe gerektirmesi nedeniyle çok fazla kullanılmamaktadır (Turner ve diğ., 2009).

4. FUMONİSİN

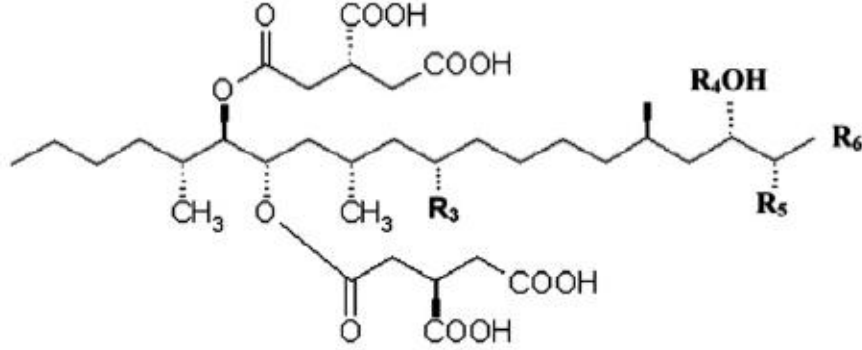
Fumonisinler genel olarak *Fusarium spp.* tarafından üretilen genellikle mısır ve mısır ürünlerinde bulunan miktoksinlerdir.(Smith, 2012).

Fumonisin kontaminasyonu, ilk kez 1988 yılında Güney Afrika'nın Transkei Bölgesi'nde tüketilen mısırlardan izole edilen *F. verticilloides* (eski adı *F. moniliforme* Sheldon MRC 826) izolatlarında tespit edilmiştir (Gelderblom ve diğ., 1988). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise gıdalarda *Aspergillus section Nigri* kaynaklı kontaminasyonların gıdalarda tespit edildiği gösterilmiştir (Logrieco ve diğ., 2010).

Fumonisinler A, B, C ve P olmak üzere 4 gruba ayrılmışlardır. A grubu fumonisinler *F. verticilloides* kültürlerinden ve bütün mısır tanelerinden, C grubu fumonisinler küflü mısırlardan, P grubu fumonisinler ise mısırdaki gelişen *F. proliferatum* kültürlerinden izole edilmişlerdir (Waskiewicz ve diğ., 2012). Gıdalarda B grubu fumonisinlerden genellikle B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) ve B₃ (FB₃)' e rastlanmaktadır (Konishi ve diğ., 2012). *F. verticilloides* kültürlerinin oluşturduğu Fumonisin B₁, kontamine gıdalarda bulunan fumonisinin %70-80' ini oluşturmaktadır. (Waskiewicz ve diğ., 2012). FB₂ ve FB₃ ise toplam fumonisin içeriğinin %10-20' sini oluşturmaktadır (Fanelli ve diğ., 2012).

Fumonisinler 19- veya 20- karbonunda aminopolihidroksil alkil zincirinin propan-1,2,3-triaryboksilik asitle iki kez esterleşmesi sonucu meydana gelmektedir. Genetik ve biyokimyasal analizler sonucunda *F. verticilloides*' in fumonisin biyosentetik gen kümesinin (FUM) 17 genden oluştuğu açıklanmıştır. FUM1 ve FUM8 gen kümeleri FB₁, FB₂ ve FB₃ mikotoksinlerinin iskeletini oluşturan 20 karbonlu zincirin sentezi için gereklidir. *A. niger* fumonisin gen kümesi, *Fusarium* FUM kümesinden daha farklıdır. *A. niger* gen kümesinde *Fusarium* FUM kümesinde olan 7 gen bulunmamaktadır. *A. niger* kümesinde eksik olan bu FUM2 geni, fumonisin molekülünün iskeletinde onuncu karbon atomunun hidroksilasyonundan sorumludur (Susca ve diğ., 2010).

Fumonisinin kimyasal yapısı Şekil 4.1’ de gösterilmiştir. Fumonisinler suda, metanol ve asetonitrilin sulu çözeltilerinde çözülebilen polar bileşiklerdir. Apolar çözeltilerde çözünemezler.



Bileşenler	Deneyisel formül	Molekül ağırlığı	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Fumonisin A ₁	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₆	763	OH	OH	NHCOCH ₃	CH ₃
Fumonisin A ₂	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₅	747	H	OH	NHCOCH ₃	CH ₃
Fumonisin A ₃	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₅	747	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
Fumonisin B ₁	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721	OH	OH	NH ₂	CH ₃
Fumonisin B ₂	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705	H	OH	NH ₂	CH ₃
Fumonisin B ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705	OH	H	NH ₂	CH ₃
Fumonisin C ₁	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₅	707	OH	OH	NH ₂	H
Fumonisin P ₁	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₆	800	OH	OH	3HP	CH ₃
Fumonisin P ₂	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₅	784	H	OH	3HP	CH ₃
Fumonisin P ₃	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₅	784	OH	H	3HP	CH ₃

Şekil 4.1 : Fumonisinin kimyasal yapısı (Waskiewicz ve diğ., 2012)

Fumonisin B₁, saf halde beyaz renkli ve higroskopik özellikte toz olup, asetonitril:su (1:1) karışımında kararlı iken metanolde kararsızdır (Waskiewicz ve diğ., 2012).

4.1 Fumonisinlerin Sağlık Üzerine Etkileri

Fumonisinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır. Atlarda kontamine yem tüketimine bağlı olarak beyin hücrelerinde ölüm ve lezyonlara yol açtığı, domuzlarda akciğer ödemlerine, farelerde karaciğer kanserini tetikleyici etki gösterdiği belirlenmiştir. Çeşitli hayvan türlerine karşı karsinogenik,

hepatotoksik, nefrotoksik ve embriyotoksik etkiler gösterdiği de ifade edilmiştir (Scott, 2010).

İnsanlar üzerine etkileri kontamine olan gıdaların tüketimi ve epidemiyolojik hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Transkei- Güney Afrika’ da 1988 yılında kontaminasyonun insanlar üzerindeki olumsuz etkileri belirlenmiştir. Afrika, Çin, Brezilya ve Amerika’ da yemek borusu kanserinin görülme oranı ile diyetle özellikle mısır tüketimiyle fumonisin ve *F. verticillioides* alımı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Ek olarak kontamine mısırların tüketimi ile nöral tüp defekti oluşumu arasında muhtemel bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Waskiewicz ve diğ., 2012).

Fumonisinler, insanlarla ilgili yetersiz veri olmasına rağmen deney hayvanları üzerine etkileri gözlemlenerek, Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından potansiyel karsinojen (2B) olarak değerlendirilmiştir (IARC, 1993). Avrupa Birliği Gıda Bilimsel Komitesi tarafından insan sağlığına potansiyel etkilerinden dolayı FB₁, FB₂, FB₃ için “Günlük Tolere Edilebilir Değer” (TDI-Tolerable Daily Intake) 2 µg kg⁻¹ vücut ağırlığıdır (EC, 2005).

4.2 Fumonisin Üreticisi Küfler

Fumonisinler genel olarak mısır ve mısır ürünlerinde bulunan mikotoksinlerdir. Genellikle *Fusarium proliferatum* ve *F. verticillioides* tarafından üretilmektedir. *F. proliferatum*’ a darı, mısır, pirinç, muz, tıbbi bitkiler, kuşkonmaz gibi ürünlerde rastlanmaktadır (Fanelli ve diğ., 2012; Kushiro ve diğ., 2012). *F. verticillioides* buğday, mısır, arpa, tıbbi bitkilerde kontaminasyona yol açmaktadır (Ravalason ve diğ., 2012; Waskiewicz ve diğ., 2012).

F. napiforme, *F. oxysporum*, *F. dlamini*., *F. nygamai* sıklıkla mısır ve mısır ürünlerinde fumonisin kontaminasyonuna neden olmaktadır (Waskiewicz ve diğ., 2012). İsviçre’ de yapılan bir çalışmada *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* ve *F. graminearum*’ un mısır ve mısır ürünlerinde bulunduğu açıklanmıştır. *F. verticillioides*, *Fusarium* türleri arasında mısırdaki kontaminasyona en sık neden olan küf türüdür (Dorn ve diğ., 2009). *F. ramigenum*’un kuru ve yaş incirde kontaminasyona neden olduğu tespit edilmiştir. (Moretti ve diğ., 2009).

Aspergillus niger’ in kahve çekirdekleri, üzüm, şıra ve şarapta kontaminasyona neden olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda *A. niger* suşlarının B₂ ve B₄ üretme kapasitesinde olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında hem

OTA hem FB₂ mikotoksinlerinin her ikisini de üretebilen *A. niger* suşları olduğu da bildirilmiştir (Frisvad ve diğ., 2007; Logrieco ve diğ., 2009a; Mogensen ve diğ., 2010). 2007 yılında yapılan bir çalışmada ilk kez *A. niger* tarafından FB₂ üretilbildiği açıklanmış, aynı çalışmada farklı bileşime sahip besi ortamlarının etkisi de incelenmiş ve sakkaroz, NaCl veya gliserol içeren ortamların *A. niger*'in fumonisin üretimini destekleyici etkisi olduğu görülmüştür (Frisvad ve diğ., 2007). Yapılan bir başka çalışmada su aktivitesinin ve kültür ortamındaki farklı bileşenlerin *A. niger* tarafından oluşturulan FB₂ miktarına etkisi incelenmiştir. En fazla FB₂ oluşumu 0,98-0,99 a_w değerinde gerçekleşmiştir. Kuru üzümlere *A. niger* inoküle edilerek yapılan bir başka çalışmada, kuru üzümün a_w değerinde azalmaya bağlı olarak fumonisin oluşum miktarında azalma gözlenmiştir (Mogensen ve diğ., 2010).

Aspergillus section *Nigri* tarafından fumonisin üretimine ilişkin taze izolatların kullanıldığı ilk çalışma Tayland'da yetiştirilen kahve çekirdeklerinde yapılmıştır. *A. niger* izolatlarının besiyerinde %67'sinin FB₂ ve FB₄ ürettiği belirlenmiştir. FB₂ üretme kapasitesine sahip iki izolatın aynı zamanda OTA da üretebildiği belirlenmiştir (Noonim ve diğ., 2009). Üzümlerde FB₂ kontaminasyonu ilk kez İtalya'da depolanan üzüm örneklerinden tespit edilmiştir (Logrieco ve diğ., 2009).

Fusarium türlerinin dağılımı ve dayanıklılığı çevre koşullarına, coğrafi bölgenin özelliklerine ve izole edildiği bitki çeşidine göre değişmektedir. Avrupa' da genel olarak, *F. graminearum* ve *F. subglutinans*' in kuzey ve nemli bölgelerde, *F. verticillioides*' in ise daha sıcak ve kuru bölgelerde baskın olarak bulunduğu bildirilmiştir (Dorn ve diğ., 2009).

F. verticilloides 22,5- 27,5°C arasında optimum gelişme göstermektedir. Küf gelişmesi için minimum a_w değeri 0,87' dir. *F. verticilloides*' in 0,85-0,86 a_w değerlerinde toksin üretmediği belirlenmiştir. *F. proliferatum*, *F. verticilloides* ile benzer özellikler göstermektedir. 0,97- 0,92 a_w değerleri arasında toksin üretebilir. 25-30 °C arasında gelişme gösterir (Sweeney ve diğ., 1998).

F. proliferatum ve *F. verticilloides* gelişmesi *Penicillium* spp. varlığından etkilenmemekte ancak, *Aspergillus* spp. ve *Fusarium* spp. varlığından etkilenmektedir (Marin ve diğ., 2004).

Fusarium türleri fumonisin dışında fusaproliferin (*F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum* ve *F. sporotrichioides*), beauverisin (*F. equiseti*, *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. poae*, *F. oxysporum* ve *F. sporotrichioides*), enniatin (*F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F.*

sporotrichioides, *F. tricinctum* ve *F. venenatum*) ve moniliformin (*F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. semitectum*) mikotoksinlerini oluşturmaktadır (Dorn ve diğ., 2009).

4.3 Gıdalarda Fumonisin Varlığı

Fumonisinler genel olarak mısır ve mısır ürünlerinde bulunup genellikle *Fusarium proliferatum* ve *F. verticillioides* tarafından üretilmektedir. Mısır ve mısır ürünlerinde yüksek kontaminasyon değerleri belirlenmiştir.

Brezilya'nın Parana şehrinden Şubat 2007- Temmuz 2010 tarihleri arasında toplanan 100 adet mısır kaynaklı gıdada (mısır unu, mısır irmiği, patlamış mısır, mısır nişastası ve mısır gevreği) fumonisin varlığı araştırılmıştır. Numunelerin %82' sinde FB₁ kontaminasyonu, %51' inde ise FB₂ kontaminasyonu tespit edilmiştir. Toplam FB₁ ve FB₂ konsantrasyonu 126- 4348 µg kg⁻¹ değerleri arasında değişmektedir. 29 mısır unu örneğinin 28' inde FB₁, 19' unda FB₂ bulunmuş, 28 mısır irmiği örneğinin 19 unda FB₁, 8' inde ise FB₂ bulunmuştur. 17 patlamış mısır örneğinin 15' inde FB₁, 10' unda FB₂ varlığı tespit edilmiştir. 15 adet mısır nişastası örneğinin 11' inde FB₁, 8' inde FB₂, 11 adet mısır gevreğinde ise 9' unda FB₁, 6' sında FB₂ kontaminasyonuna rastlanılmıştır (Martins ve diğ., 2012).

Sırbistan'ın değişik bölgelerinde tahıl ambarlarında 4-6 boyunca depolanmış 103 buğday örneğinde FB₁ analizi yapılmıştır. 2005 ve 2007 yıllarına ait bu ürünlerde yapılan çalışmalar sonucunda FB₁ varlığı tespit edilmiştir. 2005 yılına ait 28 numunenin 23'ünde 750-5400 µg kg⁻¹ (ortalama : 2079.45 µg kg⁻¹) arasında değişen değerler tespit edilmiştir. 2007 yılında ise 75 numunenin 69'unda 750-4900 µg kg⁻¹ (ortalama :918.76 µg kg⁻¹) değerleri arasında kontaminasyon miktarı belirlenmiştir (Stankovic ve diğ., 2012).

Nijerya'nın güneybatı bölgesinde marketlerden alınan toplam 100 water yam flour ve White yam örneklerinde FB₁ ve FB₂ analizleri yapılmıştır. Araştırmalar sonucunda White yam örneklerinin %32' sinde < 0.5 (LOD) ile 91 µg kg⁻¹ değerleri arasında (ortalama: 5 µg kg⁻¹) FB₁ kontaminasyonu bulunmuştur. Water yam örneklerinin ise %5 'inde <LOD ile 2 µg kg⁻¹ değerleri arasında FB₁ kontaminasyonu tespit edilmiştir (Somorin ve diğ., 2012).

Hırvatistan’ 2011 yılında hasat edilen tahıl ürünleri için fumonisin varlığı araştırılmıştır. 63 darı örneğinin 57’ sinde (%90), ortalama $1756 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında, 51 buğday örneğinin 20 ‘sinde (%39), $66 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında, 34 arpa örneğinin 5’ inde (%15), $44 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında ve 33 yulaf örneğinin 2’ sinde (%6), $28 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında fumonisin bulunduğu bildirilmiştir (Pleadin ve diğ., 2013).

İtalya’ da buğday ve mısır içeren 61 adet ekmekte FB_1 ve FB_2 varlığı araştırılmıştır. incelenen örneklerin 25’ inde FB_1 ve FB_2 kontaminasyonu saptanmıştır. Toplam FB_1 ve FB_2 kontaminasyon miktarı $142\text{-}550 \text{ pg kg}^{-1}$ ’ dir (Juan ve diğ., 2010).

Amerika’ da yapılan çalışmada 29 bira örneğinde fumonisin varlığı araştırılmıştır. İncelenen bira örneklerinin %86’ sında FB_1 ve %41’ inde FB_2 kontaminasyonu tespit edilmiştir. Toplam FB_1 ve FB_2 kontaminasyon miktarı $0.3\text{-}12.7 \text{ ng ml}^{-1}$ ’ dir. Kontaminasyon sonucunda sadece FB_2 içeren örneklerin olmadığı ancak FB_1 içeren örneklerin bir kısmının FB_2 içerdikleri gözlemlenmiştir (Hlywka ve Bullerman, 1999).

Kamerun’da yapılan bir başka çalışmada örnek olarak darı, yer fıstığı, soya fasülyesi, mısır birası, yer fıstığı çorbası, kuru-kuru ve dagwa kullanılmıştır. İncelenen 37 darı örneğinin tümünde ortalama $508 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında FB_1 , 36 tanesinde ortalama $149 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında FB_2 , 35’inde ortalama $41 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında FB_3 , 10’unda ortalama $2263 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında FB_6 kontaminasyonu tespit edilmiştir. Analiz edilen 10 soya fasulyesinin ve 14 mısır birasının tamamında FB_1 , FB_2 ve FB_3 bulunmuştur. Mısır birasında 1 örnekte $76.13 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında FB_6 kontaminasyonu tespit edilmiştir. Kullanılan 15 yer fıstığı çorbasından 11’inde ortalama $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında FB_1 , 5’inde ortalama $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında FB_2 , 1’ inde $1.88 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında FB_3 , 2’ sinde ortalama $201 \mu\text{g kg}^{-1}$ miktarında FB_6 bulunduğu bildirilmiştir. 6 kuru-kuru örneğinin 6 ‘sında da ortalama $3.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ FB_1 ve 2 ‘sinde ortalama $3.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ FB_3 kontaminasyonu bildirilmiştir (Abia ve diğ., 2013).

Kanada’da bebek mamaları üzerine yapılan bir çalışmada yulaf, arpa, soya ve pirinç bazlı tahıllar, çok tahıllı gevrek, diğ çıkarma bisküvisi, soya formülü ve kremalı mısır kullanılmıştır. Yulaf ve arpa bazlı tahıllar, soya formülü ve kremalı mısır örneklerinde fumonisin kontaminasyonu bulunmazken, soya ve pirinç bazlı tahıllar, çok tahıllı gevrek, diğ çıkarma bisküvisinde kontaminasyon tespit edilmiştir. 24 soya bazlı tahıl, 25 pirinç bazlı tahıl, 69 çok tahıllı gevrek ve 2 adet diğ çıkarma bisküvisi

analiz edilmiş ve sırasıyla 18, 1, 22 ve 1 adet örnekte fumonisin kontaminasyonu tespit edilmiştir. Ortalama kontaminasyon değerleri ise 44 ng g^{-1} , 10 ng g^{-1} , 43 ng g^{-1} ve 20 ng g^{-1} dır (Lombaert ve diğ., 2003).

Türkiye’ de Ege Bölgesinde kurutma aşamasında toplanan incir örneklerinde FB_1 varlığı araştırılmıştır. 7 farklı bölgeden 2003- 2004 yılları arasında toplanan 115 kuru incir örneğinin 86’ sında (%74.7) FB_1 kontaminasyonu belirlenmiştir ve 0.046- 3.649 $\mu\text{g g}^{-1}$ konsantrasyonları arasında bulunmuştur. Toplanan örneklerin %9.6’ sında FB_1 düzeyinin $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ’dan fazla olduğu belirtilmiştir (Karbancıoğlu-Güler ve Heperkan, 2009).

İtalya’ da Apulia bölgesinden toplanan incirlerde yapılan çalışma sonucunda incirlerin *F. ramigenum*, *F. solani* ve *F. proliferatum* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. *F. ramigenum* suşlarının kültür ortamında 1.575 mg/kg konsantrasyonuna kadar FB_1 ve FB_2 meydana getirdiği saptanmıştır. Bu çalışma ile *F. ramigenum*’ un kuru ve yaş incirlerde fumonisin oluşturma özelliği gözlemlenmiştir (Moretti ve diğ., 2010)

Türkiye’ de Ege Bölge’sinde 2011 yılında yapılan bir başka çalışmada yine kuru incir örnekleri incelenmiştir. 2004 ve 2005 yıllarında hasat edilen bu numunelerle yapılan çalışmalarda FB_1 ve FB_2 varlığı tespit edilmiştir. 2004 yılında hasat edilen 125 örneğin 64’ ünde (%52), ortalama $0.052 \mu\text{g kg}^{-1}$ FB_1 ve 12’ sinde ise ortalama $0.043 \mu\text{g kg}^{-1}$ FB_2 bildirilmiştir. 2005 yılında hasat edilen 137 örneğin 111’ inde ortalama $0.075 \mu\text{g kg}^{-1}$ FB_1 ve 44’ ünde ortalama $0.042 \mu\text{g kg}^{-1}$ FB_2 kontaminasyonu bildirilmiştir (Aksoy ve diğ.).

Kahve çekirdeklerinde fumonisin kontaminasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, 12 kahve çekirdeğinin 7 tanesinde $1- 9.7 \text{ ng g}^{-1}$ FB_2 bulunmuştur. 2 tanesinde FB_2 ile FB_4 ’ ün beraber bulunduğu bildirilmiştir (Noonim ve diğ., 2009).

Macaristan’ da kuru üzümle ilgili yapılan bir çalışmada 30 adet *A. niger/A. awamori* suşlarının 20 tanesinin fumonisin oluşturma özelliği gözlemlenmiştir. $0.017-19.6 \text{ mg kg}^{-1}$ arasında kontaminasyon miktarı değişmektedir. 7 kuru üzüm örneğinde Siyah Aspergilli tarafından $4.55-35.49 \text{ mg kg}^{-1}$ konsantrasyonunda fumonisin kontaminasyonu meydana gelmiştir (Varga ve diğ., 2010).

Üzümlerde FB_2 kontaminasyonu ilk kez İtalya’da depolanan üzüm örneklerinden tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada üzümde izole edilen 8 *A. niger* izolatının 4 tanesinin $29-293 \mu\text{g/g}$ FB_2 ürettiği bildirilmiştir (Logrieco ve diğ., 2009). Üzümlerle ilgili yapılan bir diğer çalışmada, izole edilen *A. niger* suşlarının %77’sinin

besiyerinde FB₂ ürettiği bildirilmiştir. Fumonisin üretme kapasitesine sahip 10 adet *A. niger* suşunun üzümde inokülasyonları sonucu üzümde, 171-7841 µg/kg FB₂ ve 14-1157 µg/kg FB₄ oluşumu gözlemlenmiştir. Fumonisin üreticisi 4 suş, kuru üzümde de 5-6476 µg/kg FB₂ ve 12-672 µg/kg FB₄ üretmiştir (Mogensen ve diğ., 2010).

Bir başka çalışmada şarap üretiminde kullanılmak üzere güney bölgeden toplanan 12 üzümün 2 tanesinde 0.01 µg ml⁻¹ ve 0.4 µg ml⁻¹ FB₂ kontaminasyonu tayin edilmiştir (Logrieco ve diğ., 2009).

Farklı ülkelerden alınan 77 şarap örneğinde FB₂ varlığı araştırılmış ve 18 örnekte kontaminasyon olduğu belirlenmiştir. Bu örneklerden 16' sı kırmızı, 1'i beyaz ve 1' i porto şarabıdır. Çalışma sonucunda FB₂ kontaminasyonun 1- 25 µg l⁻¹ düzeyinde olduğu belirlenmiştir (Mogensen ve diğ., 2010).

Başka bir çalışmada 51 şarap örneği ile çalışılmış ve FB₂, FB₄ varlığı araştırılmıştır. Bu şarapların 45 tanesi kırmızı, 5 tanesi beyaz ve 1 tanesi de rozedir. 9 adet kırmızı şarapta FB₂ kontaminasyonu 0.4- 2.4 ng ml⁻¹ olarak belirtilmiş, FB₄ kontaminasyonu ise bulunamamıştır (Logrieco ve diğ., 2010).

Portekiz' de şaraplar üzerine yapılan bir çalışmada *Aspergillus carbonarius*, *A. ibericus* ve *A. niger*' in kültür ortamında fumonisin oluşturma miktarları belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre *A. carbonarius*, *A. ibericus*' un FB₂ meydana getirmediği saptanmıştır. Ancak *A. niger* suşlarının kültür ortamında 0.003- 6.0 mg/kg konsantrasyonuna kadar FB₂ meydana getirdiği görülmüştür (Abrunhosa ve diğ., 2011).

Çizelge 4.1 : Gıdalarda fumonisin varlığı

Örnek	Ülke	Yöntem	Pozitif örnek sayısı/ toplam örnek sayısı		Aralık (µg/kg)		Kaynak
Mısır unu	Brezilya	HPLC- OPA	FB ₁	FB ₂	FB ₁	FB ₂	Martins ve diğ., 2012
Mısır irmiği			28/29	19/29	494	158	
Patlamış mısır			19/28	8/28	414	171	
Mısır nişastası			15/17	10/17	338	108	
Mısır gevreği			11/15	8/15	254	86	
			9/11	6/11	398	87	
Buğday	Sırbistan	ELISA	FB ₁ 92/103		FB ₁ 918.7-2079.4		Stankovic ve diğ., 2012

Çizelge 4.1 : Gıdalarda fumonisin varlığı (devamı)

Bira	Amerika	HPLC-OPA	FB ₁ 25/29	FB ₂ 12/29	FB ₁ 0.3-12.7	FB ₂ -	Hlywka ve Bullerman, 2010
Buğday ve mısır ekmeği	İtalya	LC-MS/MS	FB ₁ +FB ₂ 25/61		FB ₁ +FB ₂ 142-550		Juan ve diğ., 2010
Darı Yer fıstığı Soya fasülyesi Mısır birası Yer fs çorbası Kuru-kuru Dagwa	Kamerun	LC-ESI-MS/MS	FB ₁ 37	FB ₂ 36	FB ₃ 35	FB ₆ 10/37	Abia ve diğ., 2013
			18	12	15/35	-	
			10	10	10/10	-	
			14	14	14	1/14	
			11	5	1	2/15	
			6	-	2/6	-	
			8	8	7/8	-	
Yulaf bazlı Arpa bazlı Soya formüllü Kremalı mısır Soya bazlı Pirinçli mama Tahıllı gevrek Diş bisküvisi	Kanada	HPLC-OPA	FB ₁ +FB ₂ 18/24		FB ₁ +FB ₂ 44		Lombaert ve diğ., 2010
			1/25		10		
			22/69		43		
			-		-		
			-		-		
			-		-		
			2/1		20		
Kuru incir	Türkiye	HPLC-OPA	FB ₁ 86/115		FB ₁ 46-3649		Güler ve Heperkan, 2009
Kuru incir	Türkiye	HPLC-OPA	FB ₁ 64/125	FB ₂ 12/125	FB ₁ 52	FB ₂ 43	Aksoy ve diğ., 2011

Çizelge 4.1 : Gıdalarda fumonisin varlığı (devamı)

Üzüm	İtalya	LC-MS/MS	FB ₂ 2/12	FB ₂ 10-400	Logrieco ve diğ., 2009
Şarap	İtalya	LC-MS/MS	FB ₂ 18/77	FB ₂ 1-25	Mogensen ve diğ., 2010
Kırmızı şarap	İtalya	LC-MS/MS	FB ₂ FB ₄ 9/45	FB ₂ FB ₄ 0,4-2,4 -	Logrieco ve diğ., 2010
Water Yam White Yam	Nijerya	HPLC	FB ₁ FB ₂ 32 5	FB ₁ FB ₂ <0.5-91 <LOD 2	Somorin ve diğ., 2012
Darı Buğday Arpa Yulaf	Hırvatistan	ELISA	57/63 20/51 5/34 2/33	1756 66 44 28	Pleadin ve diğ., 2013

4.4 Fumonisinler İlgili Yasal Düzenlemeler

Gıda ve yemler için belirlenen maksimum fumonisin miktarları Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından A.B.D’ de 2001 yılında belirlenmiştir. Avrupa Birliği tarafından maksimum fumonisin miktarları 2006 yılında saptanmıştır. Ülkemizde de gıdalarda bulunan maksimum fumonisin düzeyleri 2008 yılında belirlenmiştir. Çizelge 4.2’ de çeşitli ülkelerde fumonisin ile ilgili yapılan yasal düzenlemeler verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Fumonisin düzeyleri ile ilgili gıdalardaki yasal düzenlemeler

Ülke	Ürün	Maksimum düzey (µg/g)
A.B.D ¹	Kuru öğütme ile edilmiş mısır ürünleri (Yağ içeriği kuru bazda <%2.25 olan mısır unu vb.	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ 2
	Bütün veya kısmen kuru öğütmeye elde edilmiş mısır ürünleri(	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ 4
	Kuru öğütmeye elde edilmiş mısır kepeği	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ 4
	Mısır tortilla üretiminde kullanılacak temizlenmiş mısır	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ 4
	Patlamış mısır üretiminde kullanılacak temizlenmiş mısır	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ 3
Avrupa Birliği ¹	İşlenmemiş mısır	FB ₁ +FB ₂ 2
	Mısır unu, öğütülmüş mısır, yağı alınmış öğütülmüş mısır, rafine mısır irmiği	FB ₁ +FB ₂ 1
	Doğrudan tüketilen mısır bazlı ürünler (Mısır unu, öğütülmüş mısır, yağı alınmış öğütülmüş mısır, işlenmiş bebek ve çocuk gıdaları hariç)	FB ₁ +FB ₂ 0.4
	İşlenmiş mısır bazlı bebek ve çocuk gıdaları	FB ₁ +FB ₂ 2
Türkiye ³	İşlenmemiş mısır	FB ₁ +FB ₂ 4
	Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır ve mısır bazlı ürünler	FB ₁ +FB ₂ 1
	Mısır bazlı kahvaltılık tahıllar ve mısır bazlı çerez	FB ₁ +FB ₂ 0.8
	Bebek ve çocuk ek gıdaları (işlenmiş mısır bazlı olanlar)	FB ₁ +FB ₂ 0.2
	500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır ilmiği (GTIP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelleter (GTIP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTIP 1904 10 10)	FB ₁ +FB ₂ 1.4
	500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTIP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTIP 1904 10 10)	FB ₁ +FB ₂ 2

¹ :FDA, 2001

² :EC, 2006

³ :TGK, 2008

4.5 Fumonisin Analiz Yöntemleri

Fumonisinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin belirlenmesinden sonra bu mikotoksinin nitel ve nicel olarak tespit edilebilmesi için yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Tayin için birçok analitik metot kullanılmıştır. Her metodun eksik veya zayıf bir noktası bulunmakla beraber, analizi yapılacak ürüne göre yöntem seçilmelidir. İnce tabaka kromatografisi (TLC) miktar olarak fumonisin konsantrasyonu hakkında yeterli bilgi vermez ancak nicelik olarak fumonisin düzeyi ile ilgili bilgiye ulaşılmasını sağlar. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) fumonisin analizleri için kullanılan en yaygın metottur. Bu metotta fumonisinin ölçülebilmesi, örneğin cihaza konulmadan önce florasan ışık altında okunabilmesini sağlayacak bir kimyasalın eklenmesi ile mümkün olabilmektedir. Bu metotla yapılan çalışmalarda bazen örneklerde düşük seviyelerde bulunan n-acylated fumonisin analogları tespit edilememektedir. Ek olarak bu yöntemde yoğun bir temizleme aşaması gerekmektedir. Sıvı kromatografisinde metodu geliştirmek için çalışmalar sürekli olarak devam etmektedir. Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) yöntemi, esterize olmuş yan zincirlerin hidrolize olmasına dayanır. Bu yöntemde türevlendirme için trimethylsilyl ya da trifluoroacetate kullanılır. Yöntem oldukça hassas ve seçici olmasına rağmen pahalı ekipman içerdiği için cazip değildir. ELISA, uygulanması kolay ve pahalı ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir. Bu yöntem ile FB₁ sadece nicelik olarak belirlenebilir. GC/MS, liquid secondary ion mass spectrometry, immunosorbent assays thermospray mass spectrometry ve electrospray mass spectrometry metodları plazma, üre gibi fizyolojik örneklerin analizinde kullanılır. Fumonisinlerin suda çözünürlüğü ve metabolitlerinin özelliklerinden dolayı HPLC metodunun en ideal metot olduğu konusunda araştırmacılar hemfikirler (Arranz ve diğ., 2010). Fumonisin analizlerinde örnekleme ve örnek hazırlama, ekstraksiyon, temizleme ve miktar tayini basamakları bulunmaktadır.

Ekstraksiyon işlemi, asetonitril-su ya da metanol-su karışımı ile yapılmaktadır. 1996 yılında Avrupa’ da yapılan ortak bir çalışmada mısırdaki fumonisin ekstraksiyonu organik çözügenlerle çalkalamanın (30 dk), öğütücü-karıştırıcıda muameleden daha etkin olduğunu, geri kazanımın çalkalama ile %85 iken öğütücü-karıştırıcıda %60 olduğu belirtilmiştir (Arranz ve diğ., 2010).

Temizleme işlemi C₁₈ ters faz, kuvvetli anyon değişimi (SAX), katı-faz ekstraksiyon kolonları veya immunoaffinite (IA) kolonları ile yapılmaktadır. SAX kartuşları ile saflaştırma, ters faz C₁₈ kolonlarına göre daha etkindir (Arranz ve diğ., 2010).

Türevlendirme prosedürü FB₁ analizi için HPLC metotunda uygulanmalıdır. Fumonisin molekülü floresan dedektörde okunmasını sağlayacak kromofomrlara sahip değildir. Bu yüzden analizden önce örneğin içindeki fumonisinin okunması için gerekli kimyasallar kullanılır. Bu kimyasallardan en çok kullanılan o-phthaldialdehyde (OPA)' dır. OPA türevi kararsız olduğundan kısa sürede (1-2 dk) analizi gerekmektedir (Arranz ve diğ., 2010).

5. MATERYAL VE METOT

5.1 Kırmızı Şarap Örnekleri

Çalışmada Marmara, Ege, İç Anadolu, Karadeniz ve Doğu Anadolu olmak üzere Türkiye'nin 5 farklı bölgesinden toplam 51 adet kırmızı şarap temin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar AB ülkelerinde ve Türk Gıda Kodeksi (TGK)'nde kabul edilen maksimum limitlere göre değerlendirilmiştir.

5.2 Kırmızı Şarap Örneklerinde Mikotoksin Tayini

5.2.1 Okratoksin A tayini

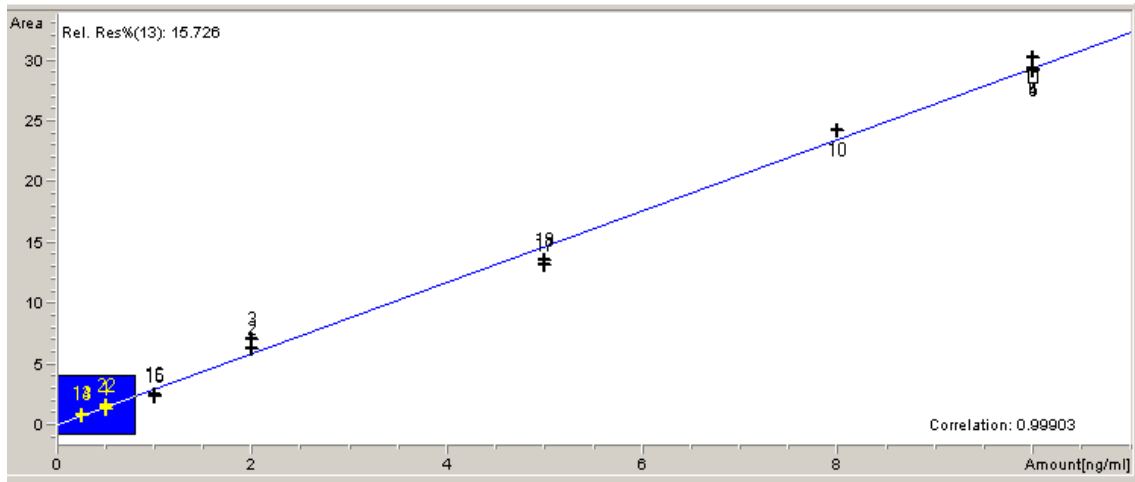
5.2.1.1 OTA standartlarının hazırlanması

Toz haldeki OTA (Sigma Aldrich O1877, $\geq$ % 98 saflıkta) standardına toluen: asetik asit (99:1, v/v) ilave edilerek 29,25 µg/ml konsantrasyonunda OTA stok çözeltisi (1. aşama standart) hazırlanmıştır. Stok çözelti karanlıkta ve -18°C' de 4 yıl kullanılabilir.

Stok çözeltiden 2,5 µg/ml konsantrasyonunda toluen: asetik asitte (99:1, v/v) 2. aşama standart çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışma standardını (3. aşama standart) hazırlamak için 0,5 ml 2. aşama standart çözeltisi azot altında kurutulmuştur. Kurutulan standart, 1-2 ml mobil faz (asetonitril:su:asetik asit, 99:99:2, v/v/v) kullanılarak çözülmüş ve daha sonra 5 ml' ye tamamlanmıştır. Böylece 0,25 µg/ml konsantrasyonunda çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Çalışmada 0,25-10 ng/ml konsantrasyonlarında kalibrasyon çözeltileri kullanılmıştır (Çizelge 5.1). Okratoksin A analizi için oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 5.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1 : Okratoksin A kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Kalibrasyon çözeltisinin konsantrasyonu (ng/ml)	Çalışma standartından alınan mikotoksin çözeltisi miktarı (µl)	İlave edilen solvent (asetonitril:su:asetik asit) miktarı (µl)
0,25	5	4995
0,5	10	4990
1	20	4980
2	40	4960
5	100	4900
8	160	4840
10	200	4800



Şekil 5.1 : Okratoksin A kalibrasyon grafiği

5.2.1.2 Geri kazanım değerin belirlenmesi

Geri kazanım oranının belirlenmesi için örnekte 2,5 ng/ml konsantrasyonunda OTA olacak şekilde standart çözeltiden şaraba enjeksiyon yapılmıştır. Örnekler toluen:asetik asit çözgen karışımının uçması için çeker ocakta 24 saat bekletilmiştir. Geri kazanım oranı %83.5 olarak bulunmuştur.

5.2.1.3 İmmunoaffinite kolonla saflaştırma ile OTA ekstraksiyonu

Kırmızı şarapta okratoksin A analizi, TS-EN 14133 metoduna göre yapılmıştır. Çalışmada analitik veya HPLC saflığında kimyasal maddeler kullanılmıştır. Immunoaffinite kolonları (ochratest) Vicam firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılacak %0,01 tween 20 içeren fosfat tampon çözeltisi (PBS - %0,01 Tween 20) hazırlamak için 8 gr sodyum klorür, 1,2 gr susuz disodyum hidrojen fosfat, 0,2 gr susuz potasyum dihidrojen fosfat ve 0,2 gr potasyum klorür 900 ml distile suda çözülmüştür. Çözeltinin pH' ı HCL veya NaOH kullanılarak 7,4' e ayarlanmıştır. 0,1 ml Tween 20 ilave edildikten sonra çözelti hacmi distile su kullanılarak 1 lt' ye tamamlanmıştır. Çalışma süresince kullanılan seyreltme çözeltisi 10 gr polietilen glikol ve 50 gr sodyum bikarbonatın yaklaşık 950 ml suda çözünmesi ve sonra 1000 ml' ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Yıkama çözeltisi ise 25 gr NaCl ve 5 gr sodyum bikarbonatın 950 ml suda çözünmesi ve 1000 ml' ye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.

10 ml örnek 100 ml erlene alınmış ve üzerine 10 ml seyreltme çözeltisi eklenmiştir. Karışım cam mikrofiber filtreden süzöldükten sonra 10 ml' si alınarak saflaştırma işlemi için Ochratest (Vicam) immunoaffinite kolondan 1-2 damla/sn hızla geçirilmiştir. Kolon daha sonra sırasıyla 5 ml yıkama çözeltisi ve 5 ml distile su ile yıkanmıştır. Kolon hava geçirilerek kurutulduktan sonra OTA, kolondan 1 damla/sn hızla 2 ml metanol geçirilerek alınmıştır. Eluat 50°C' de su banyosunda azot altında kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Kalıntı 150 µl HPLC mobil fazında tekrar çözüldükten sonra cihaza enjekte edilmiştir.

5.2.1.4 OTA analizi için HPLC koşulları

Sıvı kromatografisi, dörtlü çözgen dağıtım sistemi, 100 µl'lik döngü içeren Rheodyne enjeksiyon sistemi, floresans dedektör (λ_{ex} : 333 nm; λ_{em} : 477 nm),

degasser ünitesi içeren Agilent 1100 HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler Chemstation 3D yazılım programı ile değerlendirilmiştir. OTA ayrımı, oda sıcaklığında ODS-Hypersil C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm partikül çaplı) ters faz kolonda 1 ml/dakika akış hızında gerçekleştirilmiştir. Analizde mobil faz olarak asetonitril: su: asetik asit (99:99:2, v/v/v) kullanılmıştır. Mobil faz kullanılmadan önce Sartolon 25006-47-N (0,45 µm) filtreden süzölmüş ve ultrasonik su banyosunda 2 dakika süresince degassing işlemi uygulanmıştır. OTA analizi için kolonda alıkonma süresi yaklaşık olarak 8 dakikadır.

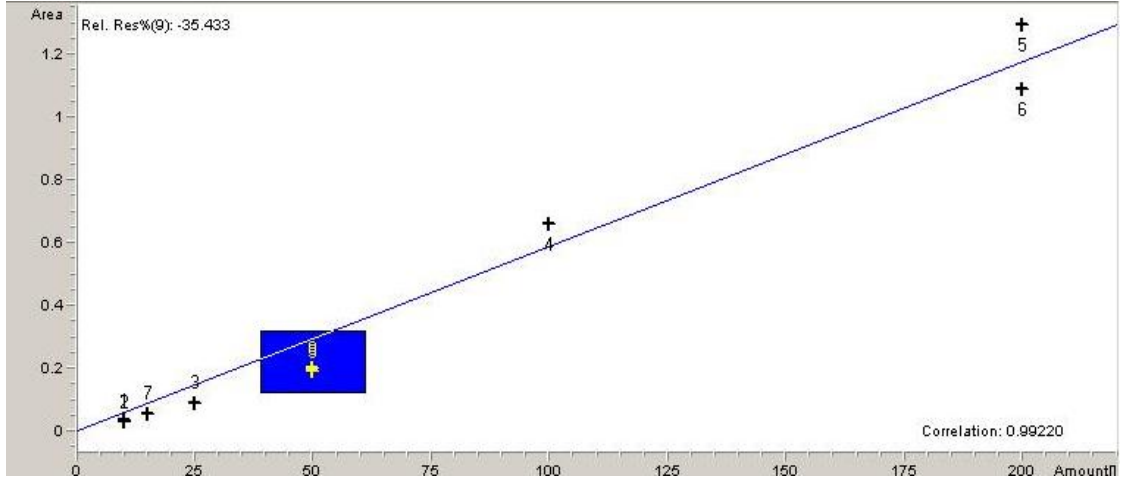
5.2.2 Fumonisin tayini

5.2.2.1 Fumonisin B₁ ve B₂ standartlarının hazırlanması

Sıvı haldeki 488,3 µl fumonisin B₁ ve B₂ (fumonisin mix solution, OKENAL) asetonitril:su (50:50) çözeltisi eklenerek 50 µg/ml konsantrasyonunda fumonisin B₁ ve B₂ stok çözeltisi (1. aşama) hazırlanmıştır. Elde edilen stok çözeltiden seyreltme yöntemi ile 10 ile 100 µg/l konsantrasyonları arasında kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır (Çizelge 5.2). Fumonisin analizi için oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 5.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 5.2 : Fumonisin kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Kalibrasyon çözeltisinin konsantrasyonu (µg/l)	1.aşama standarttan alınan mikotoksin çözeltisi miktarı (µl)	İlave edilen solvent (asetonitril:su) miktarı (µl)
10	2	998
15	3	997
25	5	995
50	10	990
100	20	980



Şekil 5.2 : Fumonisin kalibrasyon grafiği

5.2.2.2 Geri kazanım değerinin belirlenmesi

Geri kazanım oranının belirlenmesi için örnekte 75 ng/ml konsantrasyonunda Fumonisin B₂ olacak şekilde standart çözeltiden şaraba enjeksiyon yapılmıştır. Örnekler çözgen karışımının uçması için çeker ocakta 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra analizler yapılmıştır. Geri kazanım oranı %70,53 olarak bulunmuştur.

5.2.2.3 İmmunoaffinite kolonla saflaştırma ile fumonisin ekstraksiyonu

Kırmızı şarapta fumonisin analizi, Vicam firmasının ve AOAC 2001.04 “Mısır ve mısır ürünlerinde Fumonisin B1 ve B2 varlığını belirlenmesi” metoduna göre yapılmıştır. Çalışmada analitik veya HPLC saflığında kimyasal maddeler kullanılmıştır. Immunoaffinite kolonları (fumonitest) Vicam firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılacak %0,01 tween 20 içeren fosfat tampon çözeltisi (PBS - %0,01 Tween 20) hazırlamak için 8 gr sodyum klorür, 1,2 gr susuz disodyum hidrojen fosfat, 0,2 gr susuz potasyum dihidrojen fosfat ve 0,2 gr potasyum klorür 900 ml distile suda çözülmüştür. Çözeltinin pH'ı HCL veya NaOH kullanılarak 7,4' e ayarlanmıştır. 0,1 ml Tween 20 ilave edildikten sonra çözelti hacmi distile su kullanılarak 1 lt' ye tamamlanmıştır. Çalışma süresince kullanılan yıkama çözeltisi 2,5 gr NaCl ve 0,5 gr NaHCO₃' ın 100 ml suda çözünmesi ile hazırlanmıştır.

5 ml örnek alınarak Fumonitest (Vicam) immunoaffinite kolondan 1-2 damla/sn hızla geçirilmiştir. Kolon daha sonra sırasıyla 1 ml yıkama çözeltisi ve 1 ml distile su ile

yıkanmıştır. Kolon hava geçirilerek kurutulduktan sonra fumonisin, kolondan 1 damla/sn hızla 1 ml metanol geçirilerek alınmıştır. Eluat 55°C' de su banyosunda azot altında kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra AOAC metotuna geçilmiş ve kalıntı 100 µl asetonitril:su (50:50) çözeltisi kullanılarak çözüldükten sonra HPLC' ye enjekte edilmiştir.

5.2.2.4 Fumonisin B₁ ve B₂ analizi için HPLC koşulları

HPLC ile fumonisin analizi OPA reaktifi ile türevlendirmeyeyle gerçekleştirilmiştir. OPA reaktifinin hazırlanması için, 40 mg ortofital aldehit 1ml metanolde çözüldükten sonra 0,1 M Na₂B₄O₇.10H₂O ile 5 ml' ye tamamlanmıştır. Karışıma 50 µl 2-merkaptetanol ilave edilerek kahverengi renkli şişede saklanmıştır. OPA reaktifi oda koşullarında bir hafta süreyle kullanılabilir. Metanolde çözülmüş kalıntıdan 50 µl alınarak 50 µl OPA reaktifi ilave edilerek 30 saniye vortekste karıştırılmış ve 3 dakika içerisinde HPLC' ye enjekte edilmiştir. OPA türevinin floresans şiddeti zamanla azalmaya başladığı için, tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için örnekler içinde enjeksiyon zamanı sabit tutulmaya çalışılmıştır.

Sıvı kromatografisi, dörtlü çözgen dağıtım sistemi, 20 µl'lik döngü içeren Rheodyne enjeksiyon sistemi, floresans dedektör (λ_{ex} : 335 nm; λ_{em} : 418 nm), degasser ünitesi içeren Agilent 1100 HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler Chemstation 3D yazılım programı ile değerlendirilmiştir. Fumonisin ayrımı, oda sıcaklığında ODS-Hypersil C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm partikül çaplı) ters faz kolonda 1 ml/dakika akış hızında gerçekleştirilmiştir. Analizde mobil faz olarak o-fosforik asitle pH' ı 3,35' e ayarlanmış olan metanol: 0,1 M NaH₂PO₄.H₂O (77:23, v/v) kullanılmıştır. Mobil faz kullanılmadan önce Sartolon 25006-47-N (0,45 µm) filtreden süzölmüş ve ultrasonik su banyosunda 2 dakika süresince degassing işlemi uygulanmıştır.

6. BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1 Kırmızı Şarap Örneklerinde Okratoksin A Varlığı

Kırmızı şaraplarda OTA analizi, hazırlanan örneklerin ekstraksiyonu sonrasında IA kolonla saflaştırılan ekstraktların HPLC yöntemi ile analiziyle gerçekleştirilmiştir. Ters faz kolonda OTA' nın ayrımı sonrasında floresans dedektörle tespiti ve tayini gerçekleştirilmiştir.

Kırmızı şarapta OTA geri kazanım değeri % 83,5 olarak belirlenmiştir. OTA için belirleme limiti (LOD) 0,2 µg/l 'dir.

İncelenen 51 kırmızı şarap örneğinin 16' sında (%31,4) 0,0903-11,2639 µg/l arasında değişen düzeylerde OTA belirlenmiştir (Çizelge 6.1).

Çizelge 6.1 : Kırmızı şarap örneklerinde OTA varlığı

Sıra No	Bölge	OTA (µg/l)
1	İç Anadolu	0,1524
2	Ege	0,1024
3	Ege	1,2233
4	Karadeniz	0,0903
5	Karadeniz	11,2639
6	Doğu Anadolu	0,0975
7	Doğu Anadolu	0,1357

**Çizelge 6.1 : Kırmızı şarap örneklerinde OTA varlığı
(devamı)**

8	Doğu Anadolu	0,1374
9	Marmara	0,1816
10	Marmara	0,1961
11	Marmara	0,5500
12	Marmara	0,7682
13	Marmara	0,8747
14	Marmara	1,3387
15	Marmara	1,6878
16	Marmara	2,9414

İç Anadolu Bölgesinden toplanan üzümlerden elde edilen şarapların 1' inde (%12,5), Ege Bölgesine ait şarapların 2' sinde (%13,3), Doğu Anadolu Bölgesi şaraplarının ise 3' ünde (%37,5) kontaminasyon tespit edilmiştir. Karadeniz Bölgesi şaraplarının 2' sinde (%25) ve Marmara Bölgesi şaraplarının 8' inde (%66,6) OTA kontaminasyonuna rastlanılmıştır. Kırmızı şaraplarda yapılan analizler sonucunda kırmızı şaraplarda OTA' nın bölgelere göre dağılımı Çizelge 6.2' de verilmiştir.

Okratoksinlerin insan sağlığına zararlı etkilerinden dolayı Avrupa Birliği ve Türk Gıda Kodeksi tarafından şaraplarda OTA varlığı ile ilgili düzenlemeler yapılmıştır. Yasal limit 2 µg/kg olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada 16 kontaminasyonlu ürünün 2'sinde yasal limitin aşıldığı ortaya konmuştur. Yasal limiti aşan bu şarap örnekleri Marmara ve Karadeniz bölgesine ait üzümlerden elde edilmiştir. Özellikle Karadeniz bölgesinden alınan örnekte bulunan kontaminasyon miktarı dikkat çekici derecede yüksektir.

Çizelge 6.2 : Kırmızı şarap örneklerinde OTA varlığının bölgelere göre dağılımı

Bölge	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	% Pozitif	Aralık (µg/l)
İç Anadolu	8	1	12,5	0,1524
Ege	15	2	13,3	0,1024-1,2233
Karadeniz	8	2	25	0,0903-11,2639
Doğu Anadolu	8	3	37,5	0,0975-0,1374
Marmara	12	8	66,6	0,1816-2,9414

Kırmızı şaraplarla ilgili yapılan diğer çalışmalara bakıldığında, Türkiye’de yapılan çalışmaların hiçbirisinde yasal limiti aşan örneklerle rastlanılmamıştır. İspanya, İtalya, Şili, Çek Cumhuriyeti, Çin’de yapılan bir çok araştırma incelendiğinde kırmızı şarapta bulunan OTA kontaminasyonu miktarı yasal limitlerin altında bulunmaktadır. Yaptığımız çalışmada Karadeniz Bölgesinden alınan örnekte 11,2639 µg/l’ lik OTA kontaminasyonu yasal limitin çok üstündedir. Bu bölgedeki şaraplarla ilgili gerekli önlemlerin alınması halk sağlığı açısından çok önemlidir. Marmara Bölgesinden alınan örneklerin sadece 1 tanesinde OTA kontaminasyonu yasal limitin üstündedir (2,9414 µg/l). Genel olarak bakıldığında ise Marmara Bölgesinde yasal limit tek örnekte aşılsada, geri kalan bir çok örnekte OTA kontaminasyonuna rastlanılmıştır.

Türkiye iklimi, ılıman kuşak ile subtropikal kuşak arasında yer almaktadır. Ülkemizde karasal iklim, Akdeniz iklimi, Marmara iklimi ve Karadeniz iklimi görülmektedir. Doğu Anadolu Karasal ikliminde yazları sıcak, kışları ise soğuk ve uzun geçmektedir. Soğuk ay olan Ocak ayı ortalama sıcaklığı -4,2°C, sıcak ay olan Temmuz ayı ortalama sıcaklığı 24,2°C, yıllık ortalama sıcaklık 10,2°C’ dir. Yıllık ortalama nispi nem %60,2’ dir. İç Anadolu karasal ikliminde yazları biraz sıcak, kışları ise soğuktur. Soğuk ay olan Ocak ayı ortalama sıcaklığı -0,7°C, sıcak ay olan Temmuz ayı ortalama sıcaklığı 22°C, yıllık ortalama sıcaklık 10,8°C’ dir. Yıllık ortalama nispi nem %63,7’ dir. Akdeniz ikliminde ise yazları sıcak ve kurak, kışları

ılık ve yağışlıdır. Soğuk ay olan Ocak ayı ortalama sıcaklığı 6,4°C, sıcak ay olan Temmuz ayı ortalama sıcaklığı 26,8°C, yıllık ortalama sıcaklık 16,3°C' dir. Yıllık ortalama nispi nem %63,2' dir. Marmara İklimi, Karadeniz ve Akdeniz iklimleri arasında geçiş özellikleri göstermektedir. Soğuk ay olan Ocak ayı ortalama sıcaklığı 4,9°C, sıcak ay olan Temmuz ayı ortalama sıcaklığı 23,7°C, yıllık ortalama sıcaklık 14°C' dir. Yıllık ortalama nispi nem %73' tür. Karadeniz ikliminde yaz ile kış ayları arasındaki sıcaklık farkı fazla değildir. Soğuk ay olan Ocak ayı ortalama sıcaklığı 4,2°C, sıcak ay olan Temmuz ayı ortalama sıcaklığı 22,1°C, yıllık ortalama sıcaklık 13°C' dir. Yıllık ortalama nispi nem %71' dir (Şensoy ve diğ., 2009). OTA kontaminasyonlarının üzüm ve şaraplarda görülme sıklığı coğrafik farklılıklardan etkilenmektedir. Bölgelere göre yapılan meteorolojik araştırmalar incelendiğinde, yüksek nem miktarı ile OTA kontaminasyonu arasındaki ilişki dikkat çekmektedir. Karadeniz ve Marmara bölgesinde, yıllık ortalama nispi nem değerleri diğer bölgelere göre daha fazladır. Bu bölgelerden alınıp analizlenen şaraplarda OTA kontaminasyonunun miktarı ve görülme sıklığı büyük artış göstermiştir.

Üzüm ve şaraplarda OTA kontaminasyonunun coğrafik farklılıklardan etkilendiği yapılan diğer çalışmalarda belirlenmiştir. 2006 yılında üzüm ve şaraplar üzerine yapılan bir çalışmada Güney Avrupa'da ve düşük rakımlarda OTA kontaminasyon sıklığı ve miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Almanya, Fransa ve İtalya'da kırmızı şaraplar incelenmiş ve yine enlem etkisinin yani coğrafi farklılıkların OTA kontaminasyonunda önemli etkisinin olduğu doğrulanmıştır. İtalya'nın güney bölgesinde alınıp incelen kırmızı şarapların, kuzeyde üretilen şaraplara göre daha yüksek miktarda OTA içerdikleri belirlenmiştir. (Blesa ve diğ., 2006)

Genel olarak şaraplarda OTA konsantrasyonu beyaz şaraptan, pembe ve kırmızı şaraba doğru; soğuktan sıcak iklime doğru artmaktadır. Ayrıca tatlılık ve şeker oranı arttıkça OTA artışı olduğu görülmektedir (Mikulikova ve diğ., 2012; Remiro ve diğ., 2012). Tarımsal uygulamalar ve topraktaki okratoksijenik küf varlığı üzümlerde ve dolayısıyla şaraplarda OTA kontaminasyonunun değişmesinde etkilidir. Asma altlarında üzüm tanelerinin toprağa düşmesi sonucunda şekerce zengin bir ortam oluşmaktadır. *Aspergillus* spp. gelişimi, şekerce zengin bu ortam ile artmaktadır. Dökülen tanelerin toprağı karışmasından dolayı, düzenli sürülen topraklarda daha yüksek sayıda *A. carbonarius* varlığı belirlenmiştir (Leong ve diğ., 2006). Ortam

koşulları, üzüm yetiştiriciliği, şarabın içeriği, şarap yapım prosesleri kontaminasyon için önemli faktörler olsada OTA varlığının ana sebebi toksikojenik küflerden kontamine olmuş üzümlerdir (Mikulikova ve diğ., 2012; Remiro ve diğ., 2012).

6.2 Kırmızı Şarap Örneklerinde Fumonisin B₂ Varlığı

Kırmızı şaraplarda fumonisin B₂ analizi, hazırlanan örneklerin ekstraksiyonu sonrasında IA kolonla saflaştırılan ekstraktların HPLC yöntemi ile analiziyle gerçekleştirilmiştir. Ters faz kolonda Fumonisin B₂ ayrımı sonrasında floresans dedektörle tespit ve tayin gerçekleştirilmiştir.

Kırmızı şarapta Fumonisin B₂ geri kazanım değeri % 70,53 olarak belirlenmiştir. Fumonisin B₂ için belirleme limiti (LOD) 8 µg/l'dir.

Aspergillus niger' in son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda şarapta FB₂ kontaminasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Fumonisinlerin insan sağlığına olumsuz etkilerinden dolayı kırmızı şaraplarda FB₂ varlığı incelenmiştir. Marmara, Ege, İç Anadolu, Karadeniz ve Doğu Anadolu olmak üzere Türkiye'nin 5 farklı bölgesinden toplam 51 adet kırmızı şarapta yapılan analizler sonucunda FB₂ kontaminasyonuna rastlanılmamıştır. İnsan sağlığını olumsuz etkileri olan bu mikotoksinin incelenen şaraplarda bulunmaması tüketici sağlığı açısından pozitif bir sonuçtur.

7. SONUÇLAR

Bu çalışmada, Marmara, Ege, İç Anadolu, Karadeniz ve Doğu Anadolu olmak üzere Türkiye'nin 5 farklı bölgesinden toplam 51 adet kırmızı şarap temin edilmiştir. Çalışma kapsamında kırmızı şaraplarda Okratoksin A ve Fumonisin B₂ varlığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar AB ülkelerinde ve Türk Gıda Kodeksi (TGK)'nde kabul edilen maksimum limitlere göre değerlendirilmiştir.

Kırmızı şarap örneklerinde OTA ve FB₂ varlığı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile araştırılmıştır. OTA ve FB₂ analizi, hazırlanan örneklerin ekstraksiyonu sonrasında immunoaffinite (IA) kolonla saflaştırılan ekstraktların HPLC yöntemi ile analiziyle gerçekleştirilmiştir. Ters faz kolonda OTA ve FB₂ ayrımı sonrasında floresans dedektörle tespit ve tayin gerçekleştirilmiştir.

Kırmızı şarap örneklerinin 16' sında (%31,4) 0,0903-11,2639 µg/l arasında değişen düzeylerde OTA belirlenmiştir. İç Anadolu Bölgesinden toplanan şarapların 1 tanesinde (%12,5), Ege Bölgesine ait şarapların 2'sinde (%13,3), Karadeniz Bölgesi şaraplarının 2'sinde (%25), Doğu Anadolu Bölgesi şaraplarının ise 3 tanesinde (%37,5) kontaminasyon tespit edilmiştir. Marmara Bölgesinin ise 8 örneğinde (%66,6) OTA kontaminasyonuna rastlanılmıştır. Kırmızı şarap örneklerinde yapılan analizler sonucunda FB₂' ye rastlanılmamıştır.

OTA kontaminasyonlarının üzüm ve şaraplarda görülme sıklığı coğrafik farklılıklardan etkilenmektedir. Bölgelere göre yapılan meteorolojik araştırmalar incelendiğinde, yüksek nem miktarı ile OTA kontaminasyonu arasındaki ilişki ortaya çıkmaktadır. Karadeniz ve Marmara bölgesinde, yıllık ortalama nispi nem değerleri diğer bölgelere göre daha fazladır. Bu bölgelerden alınıp analizlenen şaraplarda OTA kontaminasyonu sıklıkla görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Aspergillus section Nigri* tarafından şarapta FB₂ oluşturulduğu bildirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda farklı bölgelerden alınan kırmızı şaraplarda FB₂ kontaminasyonuna rastlanılmamıştır. İnsan sağlığını olumsuz etkileri olan bu

mikotoksinin analizlenen şaraplarda bulunmaması tüketici sağlığı açısından olumlu bir sonuçtur.

Şarap yapımı sırasında OTA ve FB₂ oluşumunun engellenmesinde öncelik hammaddede kontaminasyonların önlenmesidir. Bağ alanlarında, hasat sırasında ve sonrasında kontaminasyonların önlemesi amacıyla İyi Tarım Uygulamaları (GAP), İyi Üretim Uygulamaları (GMP) ve İyi Hijyen Uygulamaları (GHP) oldukça önemlidir. Şarapta kontaminasyonların tespiti, İyi Tarım Uygulamalarının yapılmadığını veya kontamine olmuş üzümlerin kullanıldığını gösterir. İyi Tarım Uygulamaları bağ tesisi, budama, toprak işleme, sulama, hormon uygulaması, bitki koruma önlemleri ve hasat işlemlerini içermektedir. Bu basamakların her biri büyük bir titizlikle kontrol edilmelidir. Üzüm yani hammadde kontrolünün yanında, şarabın ve bulunduğu ortamın kontrolü de çok önemlidir. Fermantasyon öncesi ile fermantasyon sırasında, olgunlaştırma ve berraklaştırma aşamalarında kontaminasyonlar kontrol altına alınabilir. Fermantasyona hazırlık aşamalarının hızlı ve doğru bir şekilde yapılması, fermantasyon sırasında kontaminasyonu azaltacak özellikle mayaların kullanılması kaliteli şarap üretimi için gereklidir. Fermantasyon sonrasında durultucular yardımıyla kontaminasyon seviyesi düşürülür.

Bağ alanlarında hasat sırasında ve sonrasında uygulanan İyi Üretim Teknikleri, uygun depolama koşulları ve kaliteli hammadde seçimi ile şarapta OTA ve FB₂ varlığı önlenabilir. Ayrıca söz konusu ürünlerde mikotoksin analizleri düzenli olarak, uygun yöntemlerle yapılmalıdır. Bu tedbirlerin alınmaması durumunda oluşacak kontaminasyonlar şarapta, sağlık açısından risk oluşturmaya ve ekonomik kayıplara neden olmaya devam edecektir.

KAYNAKLAR

- Abia, W., Warth, B., Sulyok, M., Krska, R., Tchana, A.N., Njobeh, P.B., Dutton, M.F. ve Moundipa, P.F.** (2013). Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *Food Control*, **31**, 438-453.
- Abrunhosa, L., Calado, T. ve Venancio, A.** (2011). Incidence of Fumonisin B₂ Production by *Aspergillus niger* in Portuguese Wine Regions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 7514-7518.
- Akar, Y.** (2011). TR 32 Düzey2 Bölgesi' nde (Aydın, Denizli, Muğla) Bağcılık ve Şarap İmalatı., Denizli, Türkiye.
- Aktan, N. ve Kalkan, H.** (2000). Şarap Teknolojisi, Kavaklıdere Eğitim Yayınları No:4, Rekmay Ltd. Şti., Ankara. ss. 38-539.
- Amezquata, S., Gonzales-Penas, E., Dachoupakan, C., Murillo-Arbizu, M., Decerain, A.L., Guiraud, J.P.,** 2008. Ochratoxin A producing fungi isolated from stored cocoa beans. *Letters in Applied Microbiology*, **47**, 197-201.
- Anfossi, L., Giovannoli, C., Giraudi, G., Biagioli, F., Passini, C. ve Baggiani, C.,** (2012). A Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Detection of Ochratoxin A in Wine and Grape Must, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 11491-11497.
- Anlı, E., Vural, N ve Bayram, M.,** (2011). Removal of Ochratoxin A (OTA) from Naturally Contaminated Wines during the Vinification Process, *J.Inst. Brew.* **117**: 456-461
- Anlı E.ve Alkış M.İ.** (2010). Ochratoxin A and Brewing Technology: A Review, *J. Inst. Brew.*, **116**(1): p. 27.

- Anon.** (2011a). Wine Institute Table 3 World Wine Production by Country 2007-2010 And % Change 2010/2007 (Liters 000). <http://www.wineinstitute.org>, 3 Mart 2013.
- Anon.** (2011b). Wine Institute World Wine Consumption by Country 2007-2010 And % Change 2010/2007 (Liters 000). <http://www.wineinstitute.org>, 3 Mart 2013.
- Arranz, I., Baeyens, G. ve Weken, V.D.** (2004). Review: HPLC Determination of Fumonisin Mycotoxins, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**, 195-203.
- Arribas, M. V. ve Polo, M.** (2009). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*, pp. 3-5.
- Astoreca, A., Barberis, C., Magnoli, C., Combina, M., Dalcero, A.** (2009). Influence of ecophysiological factors on growth, lag phase and OTA production by *Aspergillus niger* agg. strains on irradiated corn grains. *International Journal of Food Microbiology*. **129**, 174-179.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A.** (2006). Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *International Journal of Food Microbiology*. **111**, 46-52.
- Belli, N., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J.,** 2004. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, **96**, 19-27.
- Belli, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V., Marin, S.** (2005). *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology*, **98**, 839-844.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Nester, M.A., Efraim, P. ve Taniwaki, M.H.** (2013). Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. *Food Chemistry*, **136**, 100-104.

- Çelik, C.** (2008). Adana’da Bazı Marketlerde Satışa Sunulan Çekirdeksiz Kuru Üzümlerde Ochratoxin A Varlığının HPLC Yöntemi ile Arastırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Dall’Asta, C., Galaverna, G., Bertuzzi, T., Moseriti, A., Pietri, A., Dossena, A. ve Marchelli, R.** (2010). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet, *Food Chemistry* 120: 978-983.
- DiE,** (2013). Üzüm, Devlet İstatistik Kurumu. www.tuik.gov.tr, 7 Mart 2013.
- Dorn, B., Forrer, H., Schürch, S. ve Vogelgsang, S.** (2009). *Fusarium* species complex on maize in Switzerland: occurrence, prevalence, impact and mycotoxins in commercial hybrids under natural infection, *Eur. J. Plant. Pathol*, **125**, 51-61.
- Duarte, S.C., Pena, A. ve Lino, C.M.** (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, **27**, 187-198.
- EC,** (2002). Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by The Population of EU Member State, Reports on Tasks for Scientific Cooperation, Rome, Italy, p. 22.
- EC,** (2006). Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs, B Commission Regulation (EC), EC-1881/2006, pp. 17-18.
- EFSA,** (2006). Opinion of The Scientific Panel on Contaminants in The Food Chain on A Request From The Commission Related to Ochratoxin A in Food, *The Efsa Journal* 365: 1-56.
- Er, A.** (2010). Üzüm ve Şarap İmparatorluktan Cumhuriyete. *National Geographic Türkiye*, (Aralık).
- Estreicher, S.K.** (2004). Wine the past 7400 years, 4-86.
- Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Geisen, R., Logrieco, A. ve Mule, G.** (2012). Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and FUM1 gene expression by *Fusarium proliferatum*, *International Journal of Food Microbiology*, **153**, 148-153.

- FDA**, (2001). Guidance for industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds, Food and Drug Administration, Washington, A.B.D.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U.**, (2007). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**, 9727-9732.
- Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.H.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggar, R. ve Kriek, N.P.J.** (1988). Fumonisin- Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 1806-1811.
- Gümüş, T.** (2002). Arpa, Malt ve Birada Okratoksin A (OTA) Varlığı ve Bira Üretimi Sırasında OTA'nın Maya Tarafından Parçalanması. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trakya, ss. 7-11.
- Hayat, A., Paniel, N., Rhouati, A., Marty J. ve Barthelmebs, L.** (2012). Recent advances in ochratoxin A producing fungi detection based on PCR methods and OTA analysis in food matrices, *Food Control* 26: 401-415.
- Hışıl, Y.** (1994). Enstrümental Gıda Analizleri I. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. ss. 63,67,119.
- Hışıl, Y.** (1994). Enstrümental Gıda Analizleri II. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. ss. 1,2,133.
- Hlywkay, J.J. ve Bullerman, L.B.** (1999). Occurence of fumonisin B₁ and B₂ in beer, *Food Additives and Contaminants*, **16**, 94-100.
- IARC**, (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans vol 56, Lyon, France.
- Ibáñez-Vea, M., Gonzales-Peñas, E., Lizarraga, E. ve Lopez de Cerain, A.** (2012). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin and zearalenone in barley from a northern region of Spain, *Food Chemistry* 132: 35-42.
- Ibáñez-Vea, M., Martinez, R., Gonzales-Peñas, E., Lizarraga, E. ve Lopez de Cerain, A.** (2012). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin and zearalenone in breakfast cereals from Spanish market, *Food Control* 22: 1949-1955.

- Ilic, Z., Bui, T., Tran-Dinh, N., Dang, M.N.V., Kennedy, I., Carter, D.** (2007). Survey of Vietnamese coffee beans for the presence of ochratoxinogenic Aspergilli. *Mycopathologia*, 163, 177-182.
- Iqbal, Z., Asi, M., Zuber, M., Akhtar, J. ve Saif, M.** (2013). Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial chilli and chilli sauce samples, *Food Control* 30: 621-625.
- Juan, C., Rittieni, A., Font, G. ve Manes, J.** (2010). Determination of mycotoxins produced by *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* fungi species in bread,
- Kabak, B.,** (2012). Aflatoxin M1 and ochratoxin A in baby formulae in Turkey: Occurrence and safety evaluation, *Food Control* 26: 182-187.
- Karbancıoğlu-Güler, F. ve Heperkan, D.** (2009). Natural occurrence of fumonisin B₁ in dried figs as an unexpected hazard, *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 289-292.
- Kennedy, J.** (2007). The Science of Red Wine, *The New York Academy of Sciences Magazine*, 10-13.
- Khoury, A. ve Atoui, A.** (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, **2**, 461-493.
- Kosoglu, I., Aksoy, U. ve Pehlivan, R.** (2011). Fumonisin B1 and B2 occurrence in dried fig fruits (*Ficus carica* L.) under Meander Valley's climatic conditions and relationship with fruit quality, *Food Additives and Contaminants*, **28**, 1569-1577.
- Kushiro, M., Saitoh, H., Sugiura, Y., Aoki, T., Kawamoto, S. ve Sato, T.** (2012). Experimental infection of *Fusarium proliferatum* in *Oryza sativa* plants; fumonisin B₁ production and survival rate in grains, *International Journal of Food Microbiology*, **156**, 204-208.
- Logrieco, F.A.** (n.d), Managing Ochratoxin A Contamination in The Grape-Wine Chain, Institute of Science of Food Production, Italy.
- Logrieco, A., Ferracane, R., Haidukowsky, M., Cozzi, G., Visconti, A. ve Rittieni, A.** (2009a). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must, *Food Additives and Contaminants*, **26**, 1495-1500.

- Logrieco, A., Ferracane, R., Visconti, A. ve Ritieni, A.** (2009). Natural occurrence of Fumonisin B₂ in red wine from Italy, *Food Additives and Contaminants*, **27**, 1136-1141.
- Lombaert, G.A., Pellaers, P., Mankotia, M., Neil, R. ve Scott, P.M.** (2003). Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market, *Food Additives and Contaminants*, **20**, 494-504.
- Makun, H.A., Adeniran, A.L., Mailafiya, S.C., Ayanda I.S., Mudashiru, A.T., Ojukwu, U.J., Jagaba, A.S. ve Usman, Z.** (2013). Natural occurrence of ochratoxin A in some marketed Nigerian foods. *Food Control*, **31**, 566-571.
- Mao, J., Lei, S., Yang, X. ve Xiao, D.** (2013). Quantification of ochratoxin A in red wines by conventional HPLC-FLD using a column packed with coreeshell particles. *Food Control*, **32**, 505-511.
- Martins, F.A., Ferreira, F.M.D., Ferreira, F.D., Bando, E., Nerilo, S.B., Hirooka, R.Y. ve Jr, M.M.** (2012). Daily intake estimates of fumonisins in corn-based food products in the population of Parana, Brazil, *Food Control*, **26**, 614-618.
- Meerdink, G.L.** (2002). Mycotoxins. *Clinical Techniques in Equine Practice*, **1**, 89-93
- Meulenbergh, E.L.** (2012). Immunochemical Methods for Ochratoxin A Detection: A Review. *Toxins*, **4**, 244-266.
- Mikulikova, R., Belakova, S., Benasova, K. ve Svoboda, Z.** (2012). Study of Ochratoxin A in South Moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection, *Food Chemistry* **133**: 55-59.
- Mogensen, M.F., Frisvad, J.C., Thrane, U. ve Nielsen, K.F.** (2010). Production of Fumonisin B₂ and B₄ by *Aspergillus niger* on Grapes and Raisins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 954-958.
- Moretti, A., Ferracane, L., Somma, S., Ricci, V., Mule, G., Susca, A., Ritieni, A. ve Logrieco, F.** (2009). Identification, mycotoxin risk and pathogenicity of *Fusarium* species associated to fig endosepsis in Apulia, *Food Additives and Contaminants*, **27**, 1-26.

- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C. ve Samson, R.A.** (2009). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans, *Food Additives and Contaminants*, **26**, 94-100.
- Novo, P., Moulas, G., Prazeres, D.M.D., Chu, V. ve Conde, J.P.** (2013). Detection of ochratoxin A in wine and beer by chemiluminescence-based ELISA in microfluidics with integrated photodiodes. *Sensors and Actuators B*, **176**, 232-240.
- O'Brien, E. ve Dietrich, D.R.** (2005). Ochratoxin A: The continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**, 33-60.
- Ozbey, F. ve Kabak, B.,** (2012). Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices, *Food Control* 28: 354-361.
- Ozden, S., Akdeniz, A. ve Alpertunga, B.,** (2012). Occurrence of Ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey, *Food Control* 25: 69-74.
- Pattano, D., Grosso, A., Stocco, P.P., Pazzi, M. ve Zeppa, G.** (2013). Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. *Food Control*, **33**, 54-57.
- Pleadin, J., Vahcic, N., Persi, N., Sevelj, D., Markov, K. ve Frece, J.** (2013). *Fusarium* mycotoxins occurrence in cereals harvested from Croatia fields, *Food Control*, **32**, 49-54.
- Quintela, S., Villarán, M., Lopez de Armentia, I. ve Elejalde, E.,** (2012). Ochratoxin A in Spanish exportation wine market, *Food Control* 25: 501-504.
- Quintela, S., Villarán, M., Lopez de Armentia, I. ve Elejalde, E.,** (2011). Occurrence of Ochratoxin A in Rioja Alavesa wines, *Food Chemistry* 126: 302-305.
- Quintela, S., Villaran, C., Armentia, I.L. ve Elejalde, E.** (2013). Ochratoxin A removal in wine: A review. *Food Control*, **30**, 439-445.

- Ravalason, H., Grisel, S., Chevret, D., Favel, A., Berrin, J., Sigoillot, J. ve Herpoel-Gimbert, I.** (2012). *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw, *Bioresource Technology*, **114**, 589-596.
- Remiro, R., Gonzales-Penas, E., Lizarraga, E. ve Lopez de Cerain, A.,** (2012). Quantification of Ochratoxin A and five analogs in Navarra red wines, *Food Control* 27: 139-145.
- Rhouati, A., Hayat, A., Hernandez, D.B., Meraihi, Z., Munoz, R. ve Marty, J.L.** (2013). Development of an automated flow-based electrochemical aptasensor for on-line detection of Ochratoxin A. *Sensors and Actuators B*, **176**, 1160-1166.
- Ringot, D., Chango A., Schneider, Y.J. ve Larondelle, Y.** (2005). Toxicokinetics and Toxicodynamics of Ochratoxin A, An Update, *Chemico-Biological Interactions*, Volume 159, Issue 1 (2006): 18-46.
- Romero, S.M., Patriarca, A., Fernandez Pinto, V., Vaamonde, G.,** (2007). Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits, *International Journal of Food Microbiology*. **115**, 140-143.
- Scott, P.M.** (2002). Methods of analysis for ochratoxin A. in *Mycotoxins and Food Safety*, p. 117-134. Eds. DeVries, J.W., Trucksess, M.W., Jackson, L.S., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Scott, P.M.** (2012). Recent research on fumonisins: a review, *Food Additives and Contaminants*, 29, 242-248.
- Siegel, D. ve Babuscio, T.** (2011). Mycotoxin management in the European cereal trading sector. *Food Control*, **22**, 1145-1153
- Smith, G.W.** (2012). Fumonisin. *Veterinary Toxicology*, 1206-1219.
- Solfrizzo, M., Panzarini, G. ve Visconti, A.** (2008). Determination of Ochratoxin A in Grapes, Dried Vine Fruits, and Winery Byproducts by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection (HPLC–FLD) and Immunoaffinity Cleanup, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (23), pp 11081–11086.

- Somorin, Y.M., Bertuzzi, T., Battilani, P. ve Pietri, A.** (2012). Aflatoxin and fumonisin contamination of yam flour from markets in Nigeria, *Food Control*, **25**, 53-58.
- Spadaro, D., Lore, A., Garibaldi, A. ve Gullino, M.** (2010). Occurrence of Ochratoxin A before bottling in DOC and DOCG wines produced in Piedmont (Northern Italy), *Food Control* **21**: 1294-1297.
- Stankovic, S., Levic, J., Ivanovic, D., Krnjaja, V., Stankovic, G. ve Tancic, S.** (2012). Fumonisin B₁ and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain, *Food Control*, **23**, 384-388.
- Susca, A., Proctor, R.H., Mule, G., Stea, G., Ritieni, A., Logrieco, A. ve Moretti, A.** (2010). Correlation of Mycotoxin Fumonisin B₂ Production and Presence of the Fumonisin Biosynthetic Gene fum8 in *Aspergillus niger* from Grape, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 9266-9272.
- Sugita-Konishi, Y., Kamata, Y., Sato, T., Yoshinari, T. ve Saito, S.** (2012). Exposure and risk assessment for ochratoxin A and fumonisins in Japan, *Food Additives and Contaminants, Part A*, 1-10.
- Sweeney, M.J. ve Dobson, D.W.** (1998), Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *International Journal of Food Microbiology*, **43**, 141-158.
- TGK,** (2008). Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, Türk Gıda Kodeksi. **Tebliğ No:** 2008/26, *Resmi Gazete*, No: 17.05.2008- 26879.
- Toffa, D.D., Mahnine N., Ouaffak, L., El Abidi, A., El Alaoui Faris, F.Z. ve Zinedine, A.** (2013). First survey on the presence of ochratoxin A and fungi in raw cereals and peanut available in the Republic of Niger. *Food Control*, **32**, 558-562.
- TSE 521.** Şaraplar, Türk Standartları Enstitüsü, TS-663.2/3, Ankara
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S. ve Piletsky, S.A.** (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, **632**, 168-180

- Ünal, A.** (2009). Kuru Üzüm ve Ürünlerinde Ochratoxin A Varlığının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. ss.13-51.
- Vanesa, D. ve Ana, P.,** (2013). Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation, *Food Control* 30: 675-678.
- Var, I. ve Kabak, B.** (2006). Üzüm, Üzüm Suyu ve Sarapta Ochratoxin A Sorunu, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, 24-26 Mayıs. ss. 421-424.
- Varga, J., Kocsube, S., Suri, K., Szigeti, G., Szekeres, A., Varga, M., Toth, B. ve Bartok, T.** (2010). Fumonisin contamination and fumonisin producing black Aspergilli in dried vine fruits of different origin, *International Journal of Food Microbiology*, **143**, 143-149.
- Vecchio, A., Mineo, V. ve Planeta, D.,** (2012). Ochratoxin A in instant coffee in Italy, *Food Control* 28: 220-223
- Vega, M., Rios, G., Baer, D., Mardones, C., Tessini, C., Herlitz, E., Saelzer, R. ve Ruiz, M.,** (2012). Ochratoxin A occurrence in wines produced in Chile, *Food Control* 28: 147-150.
- Vidal, A., Marin. S., Ramos, A.J., Sancho, G. ve Sanchis, V.** (2013). Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology*, **53**, 133-138.
- Waskiewicz, A., Beszterda, M. ve Golinski, P.** (2012). Occurrence of fumonisins in food- An interdisciplinary approach to the problem, *Food Control*, **26**, 491-499.

EKLER

EK A : Doğu Anadolu Bölgesi Kırmızı Şarapları HPLC Sonuç Kromatogramları

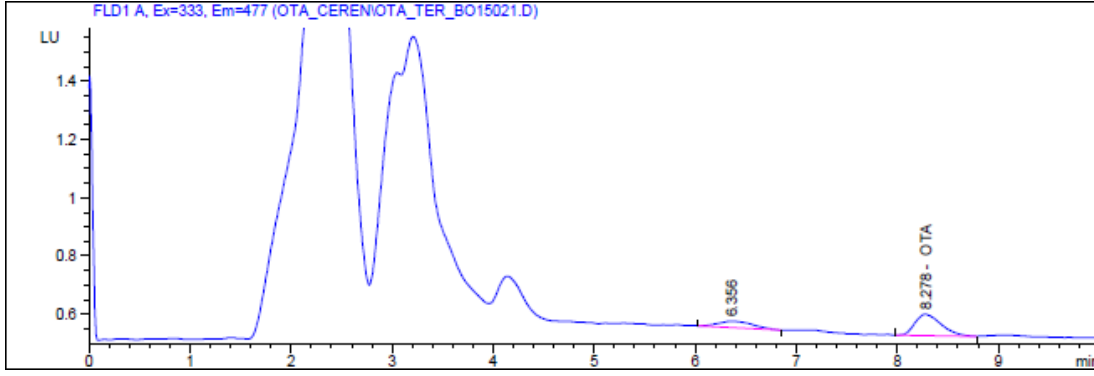
EK B : Ege Bölgesi Kırmızı Şarapları HPLC Sonuç Kromatogramları

EK C : İç Anadolu Bölgesi Kırmızı Şarapları HPLC Sonuç Kromatogramları

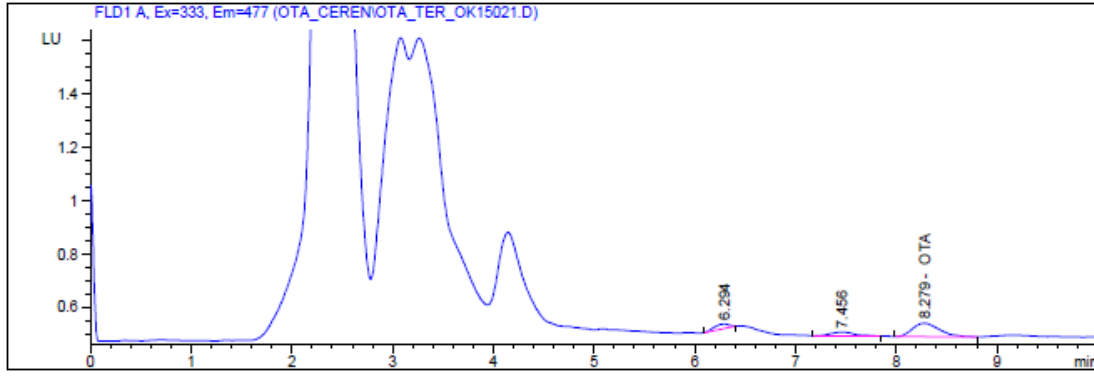
EK D : Karadeniz Bölgesi Kırmızı Şarapları HPLC Sonuç Kromatogramları

EK E : Marmara Bölgesi Kırmızı Şarapları HPLC Sonuç Kromatogramları

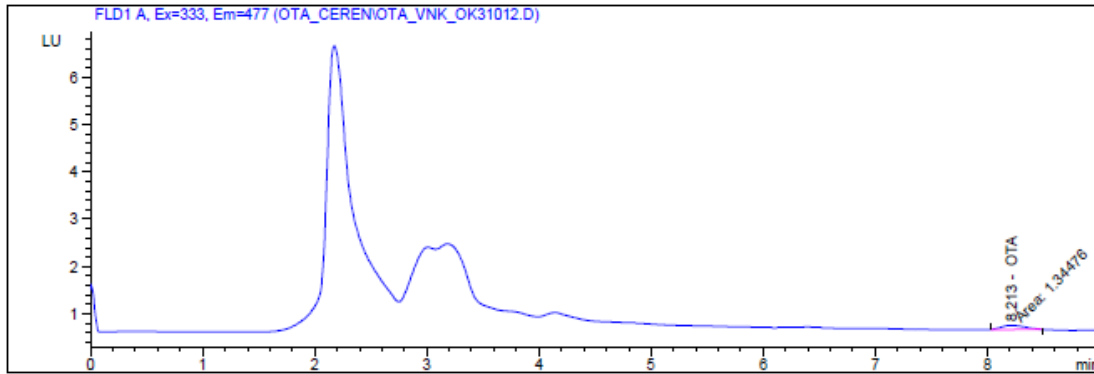
EK A : Doğu Anadolu Bölgesi Kırmızı Şarapları HPLC Sonuç Kromatogramları



Şekil A.1 : OTA_TER_BO_15021 nolu örneğe ait kromatogram.

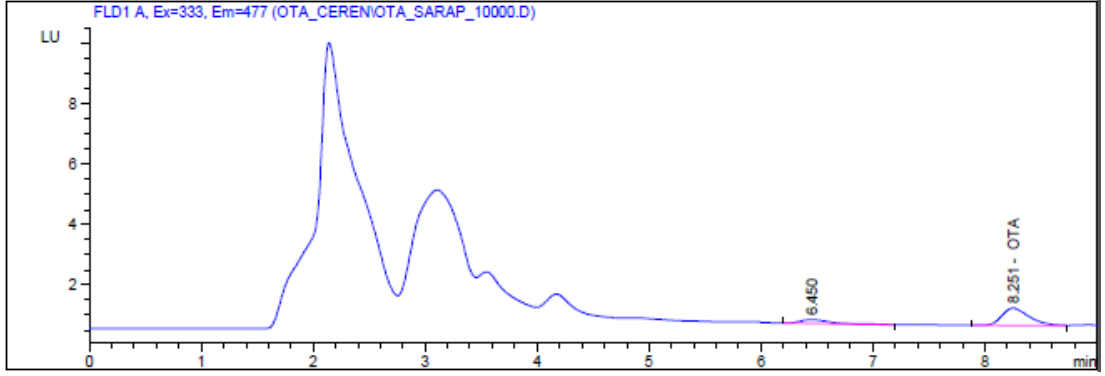


Şekil A.2 : OTA_TER_OK_15021 nolu örneğe ait kromatogram.

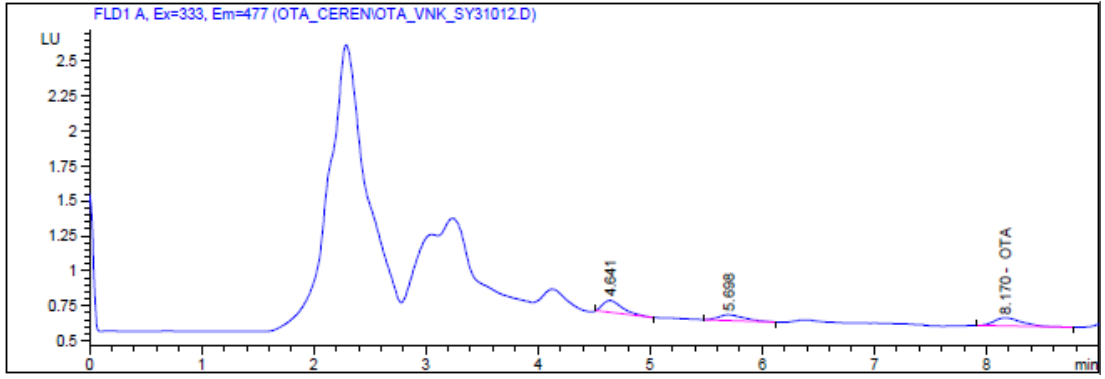


Şekil A.3 : OTA_VNK_OK_31012 nolu örneğe ait kromatogram.

EK B : Ege Bölgesi Kırmızı Şarapları HPLC Sonuç Kromatogramları

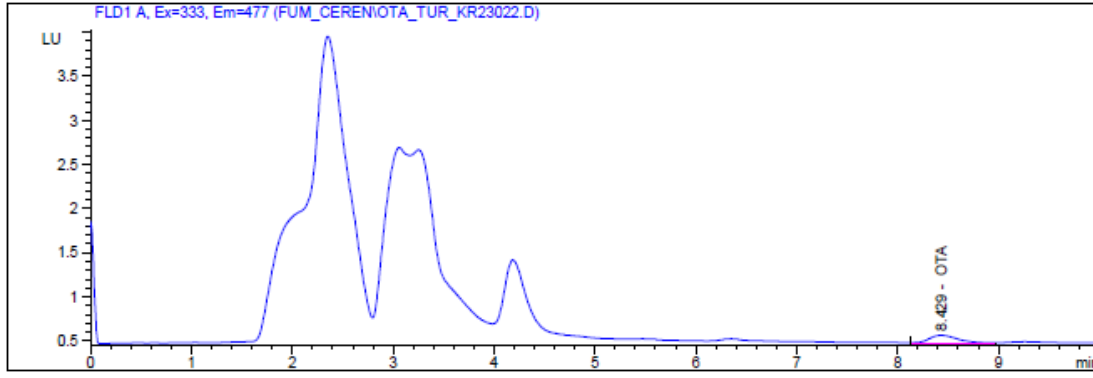


Şekil B.1 : OTA_SARAP_10000 nolu örneğe ait kromatogram.



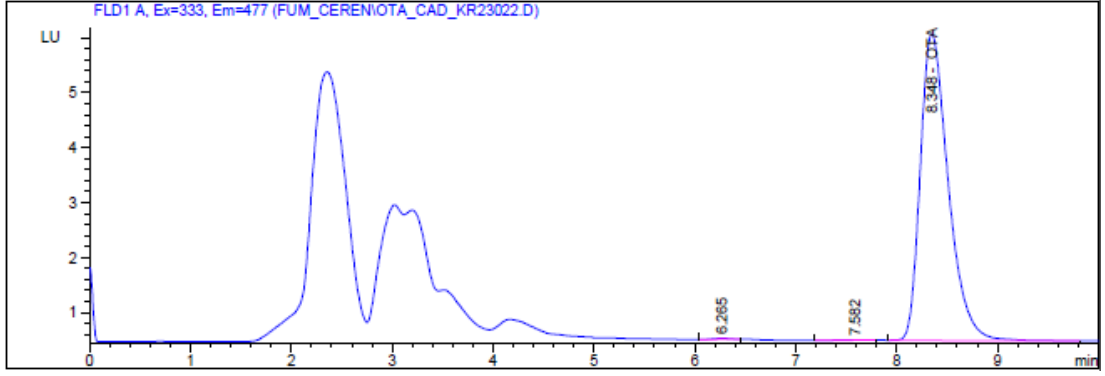
Şekil B.2 : OTA_VNK_SY31012 nolu örneğe ait kromatogram.

EK C : İç Anadolu Bölgesi Kırmızı Şarapları HPLC Sonuç Kromatogramları

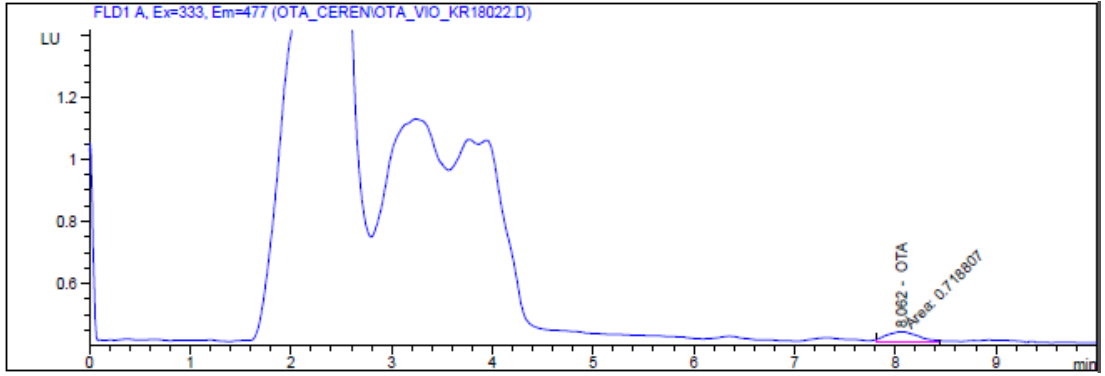


Şekil C.1 : OTA_TUR_KR23022 nolu örneğe ait kromatogram.

EK D : Karadeniz Bölgesi Kırmızı Şarapları HPLC Sonuç Kromatogramları

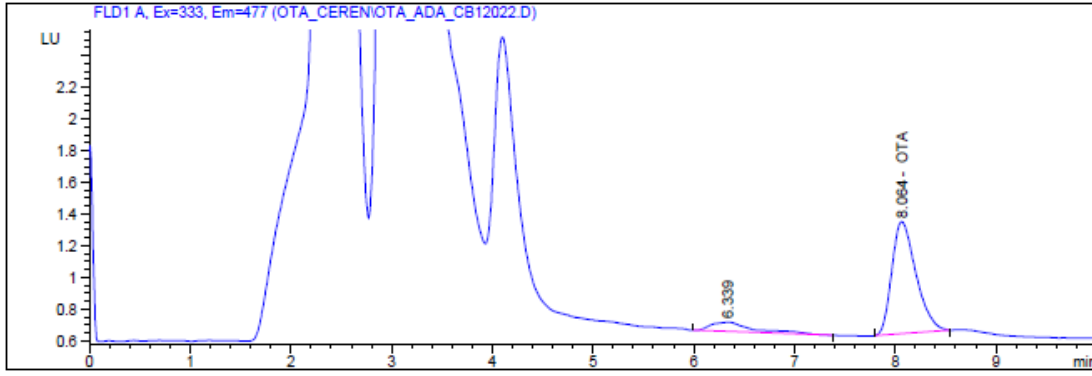


Şekil D.1 : OTA_CAD_KR23022 nolu örneğe ait kromatogram.

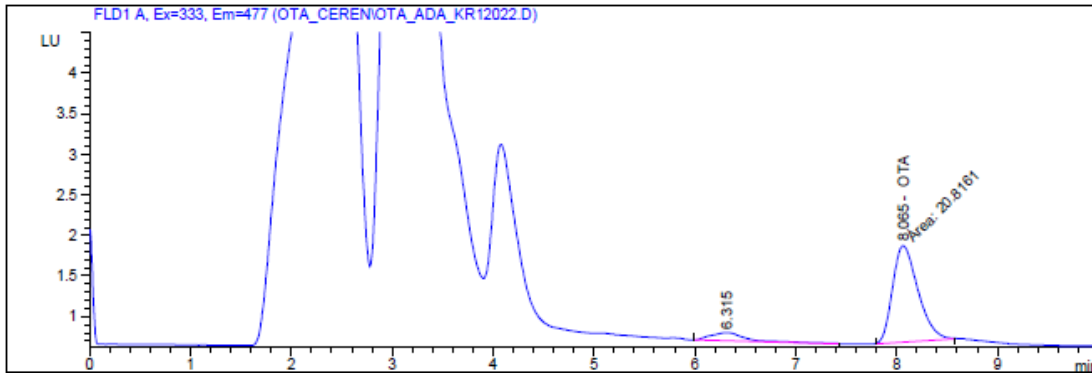


Şekil D.2 : OTA_VIO_KR18022 nolu örneğe ait kromatogram.

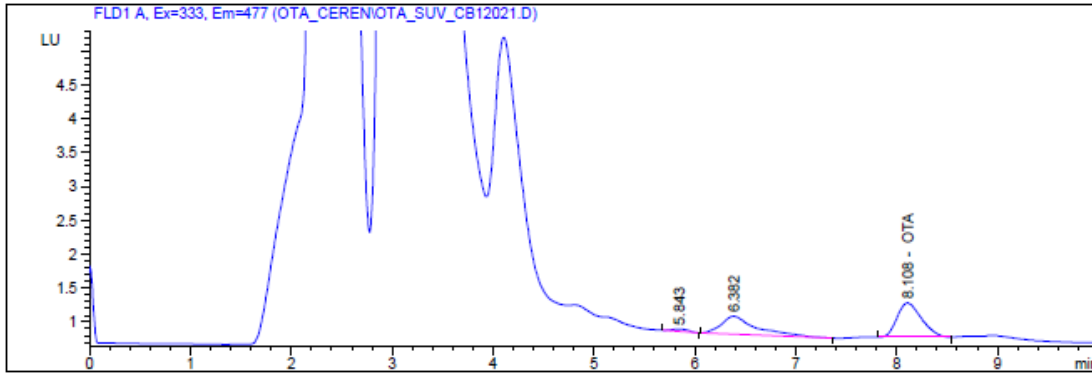
EK E : Marmara Bölgesi Kırmızı Şarapları HPLC Sonuç Kromatogramları



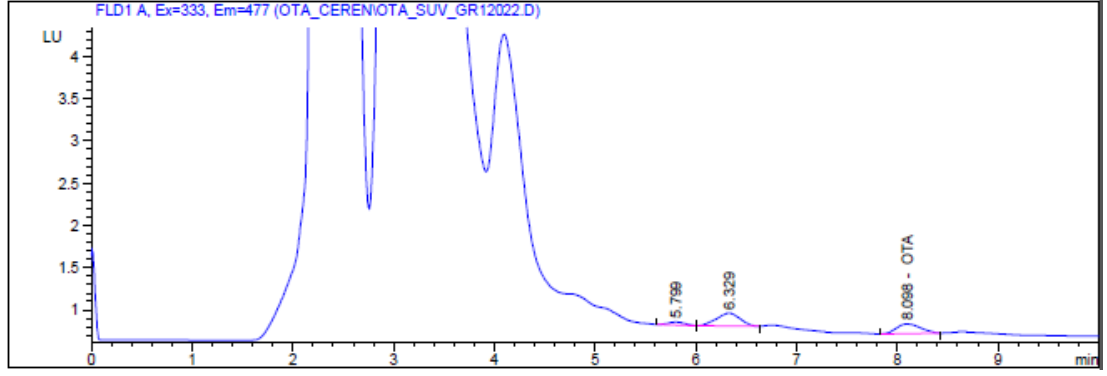
Şekil E.1 : OTA_ADA_CB12022 nolu örneğe ait kromatogram.



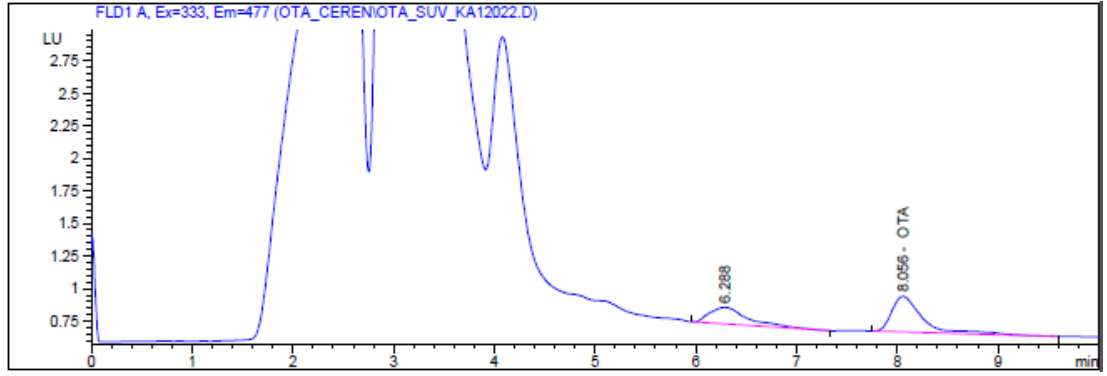
Şekil E.2 : OTA_ADA_KR12022 nolu örneğe ait kromatogram.



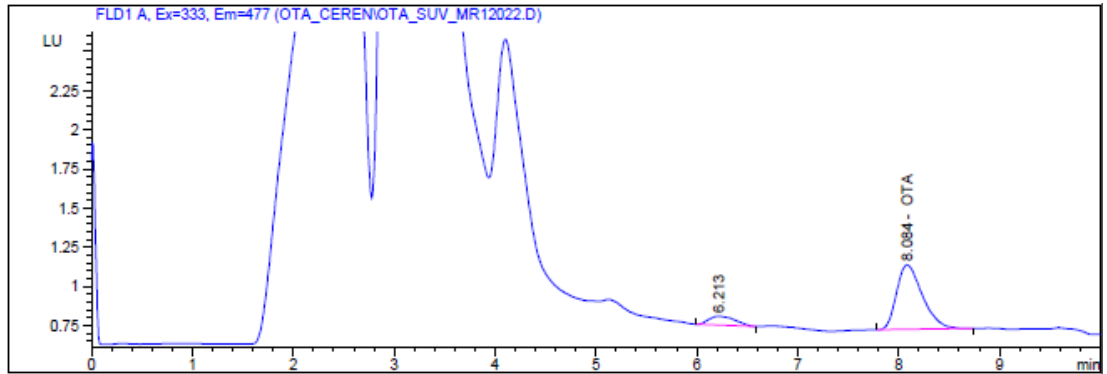
Şekil E.3 : OTA_SUV_CB12021 nolu örneğe ait kromatogram.



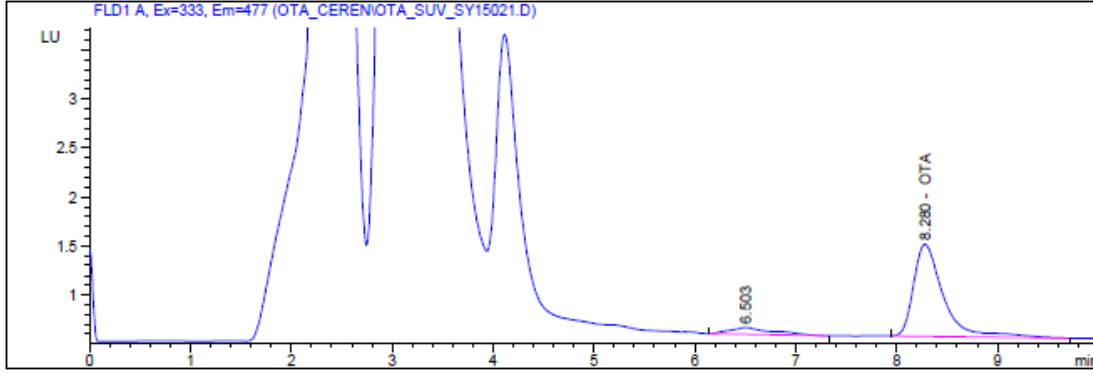
Şekil E.4 : OTA_SUV_GR12022 nolu örneğe ait kromatogram.



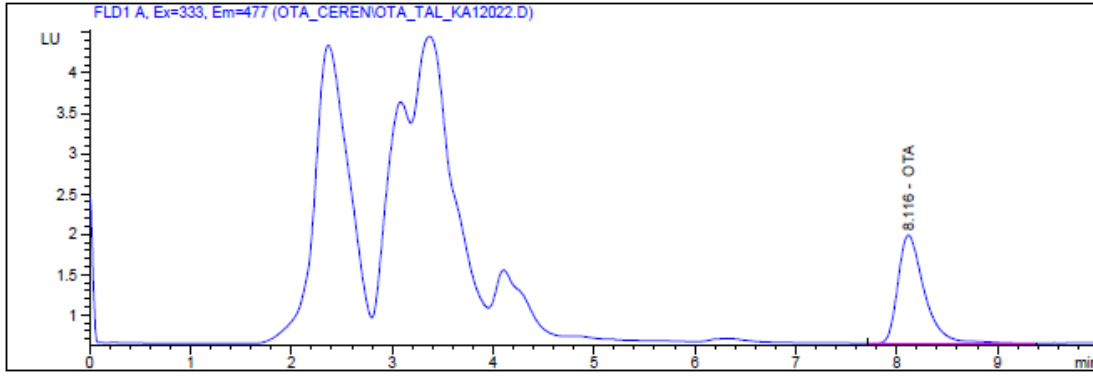
Şekil E.5 : OTA_SUV_KA12022 nolu örneğe ait kromatogram.



Şekil E.6 : OTA_SUV_MR12022 nolu örneğe ait kromatogram.



Şekil E.7 : OTA_SUV_SY15021 nolu örneğe ait kromatogram.



Şekil E.8 : OTA_TAL_KA12022 nolu örneğe ait kromatogram.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Ceren Değirmenci

Doğum Yeri ve Tarihi: Mersin/ 1987

Adres:

E-Posta: cerendegirmenci@gmail.com

Lisans: İstanbul Teknik Üniversitesi

Mesleki Deneyim ve Ödüller: Çözüm Makine San. ve Tic. Ltd.

Yayın ve Patent Listesi:

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Değirmenci, C., Heperkan, H., 2013 : The 5th International Scientific Meeting Mycology, Mycotoxicology And Mycoses, *International Congress - Determination Of Ochratoxin A In Turkish Red Wines*, April 17-19, 2013 Novi Sad, Serbia.