T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EKŞİ MAYALI BAZLAMA ÜRETİMİNDE FARKLI FERMENTASYON, PİŞİRME VE DEPOLAMA KOŞULLARININ OKRATOKSİN A VARLIĞINA ETKİSİ

Nazlı ÖZDEMİR

Danışman
Prof. Dr. Hülya GÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2023

© 2023 [Nazlı ÖZDEMİR]

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER i
ÖZET ii
ABSTRACT iii
TEŞEKKÜR iv
ŞEKİLLER DİZİNİ v
ÇİZELGELER DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 5
2.1. Mikotoksinlerin Genel Özellikleri 5
2.2. Okratoksin 11
2.3. Buğday ve Diğer Ürünler Üzerine Yapılan OTA Çalışmaları 24
2.4. Ekmek Üzerine Yapılan OTA Çalışmaları 29
3. MATERYAL ve YÖNTEM 35
3.1. Materyal 35
3.2. Yöntem 36
3.2.1. OTA ara stok çözeltisi hazırlama 36
3.2.2. Una OTA eklenmesi 36
3.2.3. Ekşi maya üretimi 36
3.2.4. Bazlama ekmeği üretiminde ön denemeler 37
3.2.4.1. Bazlama formülasyonunun belirlenmesi 37
3.4.2.2. Bazlama ağırlığının, çapının, kalınlığının ve fermentasyon sürelerinin belirlenmesi 38
3.4.2.3. Pişirme derecesi ve süresinin belirlenmesi 39
3.4.2.4. Depolama süresinin belirlenmesi 39
3.2.5. Bazlama üretimi 41
3.2.6. Bazlama örneklerinde OTA varlığının tespiti 42
3.2.6.1. Örnek hazırlama 43
3.2.6.2. İmmüno affinite kolondan geçirme 43
3.2.6.3. HPLC ile OTA tayini 44
3.3. İstatistiksel değerlendirme 45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 46
4.1. HPLC' nin Kalibrasyonu 46
4.2. Tayin Limiti (LOD), Tespit Limiti (LOQ) ve Geri Kazanım Çalışması 46
4.3. Bazlama Ekmeği Yapımında Hamur Yoğurma ve Fermentasyon Süresinin OTA Miktarına Etkisi 48
4.4. Bazlama Örneklerinde Pişirme İşleminin OTA Miktarına Etkisi 54
4.5. Bazlama Örneklerinde Depolama İşleminin OTA Miktarına Etkisi 59
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 62
KAYNAKLAR 64
ÖZGEÇMİŞ 74

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EKŞİ MAYALI BAZLAMA ÜRETİMİNDE FARKLI FERMENTASYON, PİŞİRME VE DEPOLAMA KOŞULLARININ OKRATOKSİN VARLIĞINA ETKİSİ

Nazlı ÖZDEMİR

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hülya GÜL

Mikotoksinler; Aspergillus, Penicillium gibi mantar cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan doğal toksinlerdir. İnsan sağlığı açısından en önemli mikotoksinlerden olan Okratoksin A (OTA) buğday, arpa, mısır gibi tahıl ürünlerinin yanısıra ekmek, bazlama, pide gibi tahıl ürünlerinde de bulunabilir. Bu çalışmada, ekşi mayalı bazlama üretiminde farklı fermentasyon süresinin, pişirmenin ve farklı sürelerde depolamanın OTA varlığına etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda bazlama üretiminde OTA içermeyen un, 5 µg/kg ve 10 µg/kg OTA konsatrasyonunda kirletilmiş un ve ekşi maya kullanılmıştır. Bu unlardan hazırlanan bazlama hamurlarına uygulanan farklı fermentasyon süresi (1.5 ve 3 saat), 300±5^{0}C' de pişirme ve oda şartlarında (25±2^{0}C'de) 0, 5 ve 10 gün depolama işlemleri sonrası OTA seviyesindeki değişim floresans dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-FLD) yöntemi ile belirlenmiştir. Bazlama üretiminde 5 µg/kg OTA ile kontamine edilmiş undan elde edilen hamurların OTA miktarı 3.691 µg/kg, 1.5, ve 3 saat fermentasyon işlemleri sonrası bu değer sırasıyla 3.537 µg/kg ve 3.363 µg/kg, pişirme sonrası ise 3.114 µg/kg ve 2.963 µg/kg' olarak saptanmıştır. 10 µg/kg OTA ile kontamine edilmiş undan elde edilen hamurların, 1.5 saat ve 3 saat fermentasyona bırakılması sonrası hamurların ve bu hamurlardan pişirilen bazlamaların OTA miktarları ise sırasıyla 6.444 µg/kg, 5.784 µg/kg, 5.259 µg/kg, 5.376 µg/kg ve 4.595 µg/kg olarak ölçülmüştür. Farklı depolama sürelerinin OTA varlığı üzerindeki etkisi önemsiz bulunmuştur. Elde edilen bulgular sonucunda OTA seviyesinde genel olarak bir azalma tespit edilse de özellikle yüksek konsantrasyonda (10 µg/kg) OTA bulaşısı olan unlarda uzun süreli fermentasyonun (en az 3 saat) daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Uzun süreli fermentasyon uygulanmadığı takdirde bazlama ekmeği üretimi esnasında hem 5 µg/kg hem de 10 µg/kg OTA ile kontamine edilmiş unlardan üretilen bazlamaların Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Komisyonu tarafından kabul edilebilir maksimum limit olan 3 µg/kg' ın üzerinde OTA bulundurduğu ve bu şekilde tüketime uygun olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bazlama, Mikotoksin, Okratoksin A, HPLC-FLD, Fermentasyon.

2023, 74 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

THE EFFECT OF DIFFERENT FERMENTATION, BAKING AND STORAGE CONDITIONS ON THE PRESENCE OF OCHRATOXIN A IN SOURDOUGH BAZLAMA (TURKISH TRADITIONAL FLAT BREAD) PRODUCTION

Nazlı ÖZDEMİR

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Hülya GÜL

Mycotoxins are natural toxins formed as a result of secondary metabolism of fungal genera such as Aspergillus and Penicillium. Ochratoxin A (OTA), which is one of the most important mycotoxins in terms of human health, can be found in cereal products such as bread, "bazlama" (traditional flatbread), and pita bread as well as cereals such as wheat, barley, and corn. This study, it was aimed to determine the effect of different fermentation times, baking, and storage for different periods on the presence of OTA in sourdough bazlama production. In this context, OTA-free flour, flour contaminated with OTA concentrations of 5 µg/kg and 10 µg/kg and sourdough have been used. After different fermentation times (1.5 and 3 hours), baking at 300±5^{0}C and storage at room conditions (25±2^{0}C) for 0, 5 and 10 days, the change in OTA level has been determined by high-performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLD) method. The OTA content of the dough obtained from flour contaminated with 5 µg/kg OTA in bazlama production was 3.691 µg/kg, 3.537 µg/kg, and 3.363 µg/kg after fermentation for 1.5 and 3 hours, respectively, and 3.114 µg/kg and 2.963 µg/kg after baking. The OTA contents of doughs obtained from flour contaminated with 10 µg/kg OTA, doughs left for fermentation for 1.5 hours and 3 hours and bazlama samples baked from these doughs were 6.444 µg/kg, 5.784 µg/kg, 5.259 µg/kg, 5.376 µg/kg and 4.595 µg/kg, respectively. The effect of different storage periods on the presence of OTA has been found to be insignificant. As a result of the findings, although a general decrease in OTA level has been determined, it has been found that long-term fermentation (at least 3 hours) was more effective especially in flours with high concentration (10 µg/kg) of OTA contamination. As long as long-term fermentation has not been applied, it has been determined that the bazlama produced from flours to which both 5 µg/kg and 10 µg/kg OTA were added during the production of bazlama contained OTA above 3 µg/kg, which is the maximum acceptable limit by the Turkish Food Codex and the European Commission and is not suitable for consumption in this way.

Keywords: Bazlama (flatbread), Traditional, Mycotoxin, Ochratoxin A, HPLC-FLD, Fermentation

2023, 74 pages

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması sırasında her zaman bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan her zaman guru duyacağım değerli danışman hocam Prof. Dr. Hülya GÜL'e teşekkür ederim. İstatiksel değerlendirme aşamasında yardımda bulunan Dr. Öğr. Üyesi Sultan ACUN ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet CİLBİZ' e teşekkür ederim.

Araştırmanın yürütülmesinde maddi ve manevi yardımlarını gördüğüm Biyolog Seniha DİLER, Ziraat Yüksek Mühendisi Sermet KOÇ ve tüm Isparta Gıda Kontrol Laboratuvarı Kalıntı ve Mikotoksin Birimi personeline teşekkür ederim.

FYL-2021-8457 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni maddi ve manevi desteğiyle asla yalnız bırakmayan sevgili eşim Ahmet ÖZDEMİR'e ve canım kızım Ayşe Nil ÖZDEMİR'e, tüm yaşamım boyunca bana her konuda güvenen ve manevi destek veren aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Nazlı ÖZDEMİR
ISPARTA, 2023

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. OTA, OTB ve OTC' nin moleküler yapısı 13
Şekil 2.2. HPLC sisteminin şematik görüntüsü 23
Şekil 3.1. Ekşi maya üretimi 36
Şekil 3.2. Hamurun yoğurulması 38
Şekil 3.3. Ön denemeler ile bazlama hamurlarının ağırlık, çap, kalınlık ve fermentasyon süresinin belirlenmesi 39
Şekil 3.4. Pişirme derecesi ve süresinin belirlenmesi 39
Şekil 3.5. Depolama süresinin için maya küf analizinin yapılması 40
Şekil 3.6. Bazlama yapım aşamaları ve numune alma planı 42
Şekil 3.7. Immüno affinite kolondan geçirme işlemi 43
Şekil 3.8. HPLC cihazı 45
Şekil 4.2. Geri kazanım kromatogram görüntüsü (5 µg/kg) 47
Şekil 4.3. Geri kazanım kromatogram görüntüsü (10 µg/kg) 47
Şekil 4.4. Hamur yoğurma ve fermentasyonun OTA seviyesi üzerine % etkisi 50
Şekil 4.5. Başlangıçta unda bulunan OTA miktarına göre fermentasyonun % etkisi 52
Şekil 4.6. Pişirme işleminin OTA seviyesi üzerine % etkisi 55
Şekil 4.7. Başlangıçta unda bulunan OTA miktarına pişirmenin % etkisi 56
Şekil 4.8. Bazlama yapımı sırasında OTA miktarındaki değişim (ppb= µg/kg) 59
Şekil 4.9. Depolama sürelerinin OTA düzeylerine etkisi 61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Okratoksin oluşturan küfler 14
Çizelge 2.2. Kanserojenik potansiyele göre bazı mikotoksinler 16
Çizelge 2.3. OTA'nın tahıllarda bulunabileceği maksimum limitler..... 21
Çizelge 3.1. Bazlama formülasyonu 41
Çizelge 4.1. OTA için performans kriteri 48
Çizelge 4.2. Hamurun yoğurulması, farklı fermentasyon süresi (1.5 ve 3 saat) uygulanan hamur ve bazlama örneklerinin OTA değerleri..... 49
Çizelge 4.3. Fermantasyon ve depolama sürelerinin OTA düzeylerine etkisi..... 59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFB1	Aflatoksin B1
AFM1	Aflatoksin M1
AOAC	Resmi Analitik Kimyagerler Birliği
a_w	Su aktivitesi
BEN	Balkan endemik nefropatisi
CO_2	Karbondioksit
EC	Avrupa Komisyonu
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELISA	Enzim bağlanmış immunoabsorbant yöntemi
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FLD	Fluoresan dedektör
GC	Gaz kromatografisi
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
LC	Sıvı kromotografisi
LOD	Tayin Limiti
LOQ	Ölçüm limiti
MS	Kütle spektrometresi
O_2	Oksijen
OTA	Okratoksin A
OTB	Okratoksin B
OTC	Okratoksin C
ppb	µg/kg
RASSF	Gıda ve Yem için Hızlı Alarm Sistemi
RIA	Radio-immunassay
TCIN	Tunus nefropatisi
TLC	İnce tabaka kromatografisi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Tahıl bazlı ürünler, küresel çapta birçok insanın diyetinin bir parçası olup ticari olarak da fazlasıyla kullanılan önemli bir besin kaynağıdır (Khaneghah vd., 2022). Bunlar arasında ekmek ve çeşitleri (bazlama, pide gibi) günlük yaşam içerisinde en sık tüketime sahip olan ürünlerdir.

Tahılların *Aspergillus ochraceus* (*A.ochraceus*) ve *Penicillium verrucosum* (*P.verrucosum*) cinsi çeşitli mantarlar tarafından kontamine olması sonucu en yaygın oluşan mikotoksin Okratoksin A (OTA)' dır (Avrupa Komisyonu, 2022). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), hasat öncesi, hasat sırasında ya da depolama esnasında herhangi bir yolla oluşan OTA' nın ısıtmaya karşı stabil olduğunu, 180^0C' nin üzerindeki sıcaklıklarda %90 oranında kayıp gözlendiğini bildirmiştir (EFSA, 2020). Tahıl işleme prosesinde etkin yapılan temizleme ve öğütme işlemleriyle bile mikotoksinler tamamen ayrıştırılıp ortadan kaldırılamaz. Böylece bu toksinler tahıl bazlı ürünler yoluyla insanlara bulaşabilmekte ve sağlık açısından büyük bir tehdit unsuru oluşturmaktadır (Khaneghah vd., 2022).

OTA'nın, karsinojenik, immünotoksik, nefrotoksik, teratojenik ve muhtemel nörotoksik özellikte olduğu ayrıca insanlarda uzun bir yarılanma ömrüne sahip olduğu bildirilmiştir (Avrupa Komisyonu, 2002). OTA, 2001 yılında Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) tarafından nefrotoksik ajan olarak adlandırılmış; Romanya, Bulgaristan gibi Balkan ülkelerinde görünen Balkan Endemik Nefropatisi (BEN) olarak adlandırılan böbrek rahatsızlıkları ile ilişkilendirilmiştir (JECFA, 2001). Aynı zamanda Tunus Nefropatisinin (TCIN)de başlıca sebebi olarak gösterilmektedir (El Khoury ve Atoui, 2010; Bosco ve Mollea; 2012). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), okratoksini 1993 yılında "muhtemel kanserojenik madde (2B)" olarak derecelendirmiştir (IARC, 2022).

Son yıllarda mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki potansiyel etkilerine ilişkin genel endişe giderek artmaktadır. Oluşan toksinin seviyesini

izlemek ve kontrol etmek için birçok ülkede yetkililerce önlemler alınmaktadır (El Khoury ve Atoui, 2010). Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Avrupa Birliği gibi çeşitli kuruluşların bu konudaki yaklaşımları ise, teknolojik olarak mümkün olan en düşük değerde toksin içeren ürünün tüketiciye ulaştırılmasıdır (Çelik, 2008). Mikotoksinler için limit belirleme sürecinde çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Bunlar, riski değerlendirmek için bilimsel faktörleri (toksikolojik verilerin mevcudiyeti gibi), gıda tüketim verilerini, ürünlerin mikotoksin seviyesi ve ürün içindeki dağılımı hakkında bilgiyi ve analitik metodolojiyi içerir. Ayrıca ticari çıkarlar ve gıda güvenliği sorunları gibi ekonomik faktörlerin de etkisi vardır (El Khoury ve Atoui, 2010).

OTA, dünyanın her yerinde tahıllar ve tahıl ürünleri, kakao, kahve çekirdekleri, kahve, kuru meyveler, baharat ve üzüm suyu gibi çeşitli bitki ürünlerinde doğal olarak bulunduğu gibi domuz böbreği gibi hayvansal kaynaklı ürünlerde de tespit edilmiştir. İnsan kanında OTA' nın konsantrasyonu ve görülme sıklığı, gıda maddelerinin sıklıkla kontamine olduğunu göstermektedir (Avrupa Komisyonu, 2002).

Avrupa Komisyonu (EC)' nun 12 Mart 2002 tarihli 472/2002 sayılı komisyon direktifinde OTA' nın maksimum seviyeleri belirlenmiştir. Direktife göre bu OTA seviyeleri işlenmemiş çiğ tahıl ve tahıl tanelerinde 5 µg/kg, işlenmiş ve insan tüketimine sunulmuş tüm tahıl ürünlerinde 3 µg/kg, kurutulmuş şarap meyvelerinde (kuru üzüm gibi) 10 µg/kg' dır (Avrupa Komisyonu, 2002). Şu anda ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), gıda ve yemlerde OTA için düzenleyici yönergeler belirlememiştir (Yu vd., 2020). Tarım ve Orman Bakanlığı, 2002 yılında 2002/63 numaralı 'Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ' ile işlenmemiş tahıl taneleri, tahıl bazlı işlenmiş ürünler ve kuru üzüm de OTA için Avrupa Komisyonu'nun limitlerini kabul etmiştir. (24885 sayılı Resmi Gazete, 2002).

Mikotoksin belirlemede özellikle numune hazırlama kısmı seçici olduğunda Resmi Analitik Kimyagerler Birliği (AOAC) ve Avrupa Standardizasyonu, gıda ve

yemler için fluoresan dedektörlü (FLD) yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC)' ni en uygun yöntem olarak önermişlerdir. (Iqbal, 2021).

Tahıllar, endüstriyel veya geleneksel, farklı teknolojik işleme yöntemlerinin kullanımını içeren bir ürün yelpazesinde gıda olarak çeşitli kullanımlara sahiptir. Ekmek özellikle buğdaydan, çavdardan ve mısırdan yapıldığından en önemlilerinden biridir ve birçok çeşidi bulunmaktadır (Duarte vd., 2010a). Dünyada tandır, pide, tortilla, lavaş, bazlama, yufka gibi farklı isimlerle bilinen birçok yassı ekmek türü vardır. Türkiyenin geleneksel yassı ekmekleri pide ve bazlama olup; bazlama, mayalı, tek katmanlı, krem sarı renkli, ortalama 10-20 cm arasında çapta, 2-3 cm kalınlıkta bir ekmek türüdür. Bazlama ekmeği yapımı için una, tuz, ekşi maya ve su ilavesiyle optimum hamur gelişimi elde edilene kadar yoğurulan hamur, şekil verilerek fermentasyona bırakılır. Sonra hamurlar sac üzerinde pişirilir. Bazlama genellikle ev yapımı olup, yaygın olarak köylerde yapılmakta ve tüketilmekteyken, günümüzde şehirlerde de popülerliği ve tüketimi artmıştır (Emeksizoğlu, 2016).

Gıdaların işlemesi, gıda güvenliğinin sağlanmasında ve hammaddedeki mikotoksin kontaminasyonunun azaltılmasında kritik rol oynamaktadır. OTA' nın kararlı yapısı nedeniyle birçok gıda işleme yöntemiyle tamamen yok olmadığı ama azaldığı tespit edilmiştir. Gıda işleme sırasında; fiziksel işlemler (temizleme ve öğütme) ve ısıl işlemler (ekstrüzyon, pişirme, demleme, fırınlama, kızartma, kavurma gibi)'in mikotoksinlerin stabilitesi üzerine etkileri Bullerman ve Bianchini (2007) tarafından yapılan bir çalışmada araştırılmış ve mikotoksinlerin bu işlemlere karşı belli bir dereceye kadar stabil kaldığı belirlenmiştir. Araştırıcılar toksin seviyesini düşürmedeki en etkili işlemin, ayırma, temizleme gibi çürümüş parçaların veya tanelerin fiziksel olarak uzaklaştırılması ve 150^0C'nin üzerinde pişirme ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte Milani ve Maleki, (2014), mikotoksinlerin azalma miktarının büyük ölçüde sıcaklık, süre, su ve pH gibi pişirme koşullarına ve gıdadaki konsantrasyonuna bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan bazı araştırmalarda; tahıl bazlı ürün (ekmek, kurabiye gibi) üretiminde kullanılan fermentasyon ve pişirme aşamalarının, son üründeki OTA seviyesinde önemli

derecede azalma sağladığı (Valle-Allegra vd., 2009; Savaş, 2016), bazı araştırmalarda hiç etkilemeği (Osborne vd. 1996; Scudamore vd., 2003), bazı araştırmalarda ise Okratoksin seviyesinin arttığı (Vidal vd., 2014a, b; Peng vd., 2015; Yu vd., 2020; Khaneghah vd., 2022) tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda, üretimde birçok girdinin olması, mikotoksinin türü, başlangıç konsantrasyonları, uygulanan formülasyon, hamurun yoğurulma süresi, fermentasyon koşulları (sıcaklık, süre, nem, fermentasyona dahil olan mayanın suşu), pişirme koşulları (hamurun şekli, boyutu ve havalandırılması, sıcaklık, süre), depolanması gibi faktörlerin farklı olması undan nihai ürüne geçen OTA miktarında ürünler arasında farklı sonuçlar elde edilmesine sebep olmuştur.

Mikotoksin oranı düşük veya hiç mikotoksin içermeyen unlarla üretim yapılması temel hedef olarak belirlense de; üretim esnasında toksinin ne oranda azaldığını tespit etmek de önem arz etmektedir. Bu çalışmada; bazlamanın hammaddesi undan kaynaklanan OTA miktarının (5 µg/kg ve 10 µg/kg konsantrasyonda kirletilmiş), hamurun yoğurulması, 25±5^{0}C'de 1.5 saat ve 3 saat ekşi mayalı fermentasyon işleminin uygulanması ve sac üzerinde 300±5^{0}C sıcaklıkta ekmeğe nazaran kısa sürede (10 dakika) pişirilmesi ve oda şartlarında (23-25^{0}C) 10 güne kadar depolanması gibi üretim prosesinden ne kadar etkilendiği araştırılmış, bazlama ekmeği üretimi sırasında OTA' da meydana gelen değişimin izlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Mikotoksinlerin Genel Özellikleri

Buğday, tüm dünyada ıslahı yapılmış *Triticum* cinsine bağlı tek yıllık otsu bir bitki türü olmasının yanı sıra en çok üretilen ve tüketilen tahıldır. Karasal iklim başta olmak üzere hemen her iklimde yetiştirilen buğday, Türkiye' de iklim şartlarının uygunluğu nedeniyle fazlasıyla yetiştirilmektedir (Yılmaz, 2014; Atar, 2017). FAO' nun 2020 yılında yayınladığı verilere göre dünyada yetiştirilen buğday miktarı yaklaşık 761 milyon ton, Türkiye' de ise 20.5 milyon tondur (FAO, 2022). İyi bir karbonhidrat, protein ve vitamin kaynağı olarak kabul edildiğinden buğdayın büyük bir kısmı un olarak insan tüketimi amacıyla kullanılırken kalan buğday ise hayvan yemi olarak değerlendirilir. Bununla birlikte en çok tüketilen gıdalardan olan ekmek ve ekmek çeşitleri genel popülasyonda temel bir besin maddesidir (Ünüsan, 2019). Türkiye' de günlük enerji ihtiyacının %43'ü tahıl ve tahıl ürünlerinden sağlanmaktadır. Tahıllar arasında buğdayın oranı %19' dur (Atar, 2017).

Mikroorganizmalar, buğday gibi tahıl ürünlerinin ve çeşitli gıda maddelerinin yapısında doğal olarak bulunabilmekte ya da onları dışarıdan kontamine edebilmektedirler (Çelik, 2008). Gıda maddelerinin toksin üretmesine sebep olan bu mikroorganizmalar içinde küfler, oluşturdukları olumlu veya olumsuz değişikler nedeniyle hem gıda maddelerinin bozulmasına ve oluşturdukları metabolitler nedeniyle çeşitli hastalık ve zehirlenmelere yol açmaktadırlar. Gıdalar üzerindeki olumsuz etkileri acılık, istenmeyen koku oluşumu, renk bozulması, besin kaybı ve mikotoksin oluşumu olarak sayılabilir (Topal vd., 1999; Savaş, 2016). Bu küflerin en önemlileri *Aspergillus, Alternaria, Fusarium, Penicillium* olup, bunlar mikotoksijenik küfler olarak adlandırılmaktadırlar (Berthiller vd., 2013). Mikotoksinler bu küf cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı, patojenik ve bozulma etmeni olan çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir (Bennett ve Klich, 2003; Kabak ve Var, 2006; Öksüztepe ve Erkan, 2016; Ünüsan, 2019).

Mikotoksin adı Yunanca mantar mykes ve Latince zehir anlamına gelen toxicum kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur (Cengiz, 2015; Öksüztepe ve Erkan, 2016). 1930 yılında toksik olan küf metabolitlerine mikotoksin denilmiş ama bu konudaki en yoğun çalışmalar 1960 yılından sonra başlamıştır. 1960'lı yıllarda İngiltere'nin kuzey ve güneydoğusunda 100.000' den fazla hindi palazı ve on binlerce sülün ve ördeğin ölümü sonucunda yapılan araştırmalarla ilk kez aflatoksin varlığı ortaya çıkarılmış, bu hastalık "Turkey X Disease" olarak adlandırılmıştır. *Aspergillus flavus* (*A. flavus)* ile kontamine olmuş Brezilya yer fıstığı küspelerinin hayvanlar tarafından tüketilmesiyle ortaya çıkan ölümler nedeniyle "a-flavus-toxin"'in kısaltması olarak bu toksine aflatoksin ismi verilmiştir (Cengiz, 2015; Savaş, 2016).

Günümüzde 100'ün üzerinde küf türü tarafından üretildiği bilinen 400'den fazla ikincil metabolit varlığı bildirilmiştir. Çevre şartlarının uygun olması durumunda mikotoksin üreten bu 400 adet küf türü arasında insan sağlığı açısından en tehlikeli olanlarının aflatoksin ve OTA olduğu bilinmektedir (Kabak ve Var, 2006; Gürhayta ve Çağındı, 2015; Öksüztepe ve Erkan, 2016). Bunlar içerisinde *Aspergillus, Penicillium* ve *Fusarium* genuslarına ait olan türler insan ve hayvanlarda güçlü akut veya kronik sağlık problemlerine yol açan mikotoksinleri oluşturabilmektedirler. Karsinojenik, östrojenik, teratojenik (embiryonal zararlanmalar) hepatoksik (karaciğer zararlanmaları), nefrotoksik (böbrek sisteminde zararlanmalar), tremorgenik (titreme ve refleks kayıpları sorunları), hemoraljik (doku ve organlarda kanama sorunları), dermatoksik (deride lezyonlar), nörotoksik (sinir sistemi zararlanmaları) gibi sorunlar bu rahatsızlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca ölüme neden olan akut risklerde mevcuttur (Topal vd., 1999; Topal, 2003; Cengiz, 2015; Keyvan ve Yurdakul, 2015; Öksüztepe ve Erkan, 2016). Organlar arasında en çok etkilenen karaciğerdir. Bu sebeple mikotoksinlerin çoğu hepatotoksik karakterdedir (Tiryaki vd., 2011).

Mikotoksin kontaminasyonu iklim koşullarına, ürünün cinsine, coğrafi konuma bağlı olarak mevsimden mevsime, yıldan yıla değişiklik gösterebilmektedir. Ancak toksin üreten funguslar tahıl ürünlerin yetişmesi süreci hasat öncesinde,

hasat sırasında, ve hasat sonrası depolama sırasında gıdaya bulaşıp 3 ayrı dönemde gelişim gösterebilirler (Girgin vd., 2001). *Fusairum* hasat öncesi veya sonrasında, *Penicillium* ve *Aspergillus* türü küfler ise kurutma işlemi ve sonrası depolama esnasında bulaşıp toksin üretebilmektedirler. Mikotoksinler fungal kaynaklı olarak tanımlanır ama üretmiş oldukları toksinlerin hepsi mikotoksin olarak adlandırılmazlar. Bunda metabolitlerin hedefi ve konsatrasyonu önemlidir. Bitkiler üzerinde toksik etki gösteren fungal ürünlere bitki patologları tarafından fitotoksin denilmekte, *Penicillium* türlerinin metabolitleri gibi bakteriler üzerinde toksik etki gösteren fungal ürünlere ise antibiyotikler denilmektedir (Topal, 2003; Bennett ve Klich, 2003; Tiryaki vd., 2011; Öksüztepe ve Erkan, 2016).

Mikotoksin gıdalara direk, dolaylı (Duarte vd., 2010a; Bosco ve Mollea; 2012) yollarla bulaşır. Gıdanın gözle görülür derecede küflenmesi mikotoksinin direk kontaminasyona işarettir. Dolaylı kontaminasyon, mikotoksinli hammaddelerin ve katkı maddelerinin gıda üretiminde kullanılması sonucu oluşur (Tiryaki vd., 2011). Muñoz vd. (2013) tarafından Almanya'da yapılan bir çalışmada anne sütünde bulunan OTA miktarı araştırılmış, bu sonuçlar tolere edilebilir günlük alım değerleriyle karşılaştırılmıştır. Toplanan 90 süt örneğinin %50' den fazlasında OTA tespit edilmiş olup, %29' unda 3 ng/kg olan tolere edilebilir günlük alım değerini aştığı görülmüştür. Cengiz (2015), Erzurum ilinde ikamet eden annelerin sütlerinde Aflatoksin M1 (AFM1) varlığını belirlemeye yönelik yapılan bir araştırmada ise; analiz edilen örneklerin %57.78' inde AFM1 konsantrasyonu 0.0049–0.01503 ppm (µg/kg) arasında değişmiş ve ortalama 0.006182±0.001748 ppm (µg/kg) olarak tespit edilmiştir. Anne sütü örneklerinin tamamında bulunan AFM1 konsantrasyonun Türk Gıda Kodeksi (TGK) 'ne göre kabul edilebilir sınırlarda olduğu saptanmıştır.

Mikotoksin oluşumu üzerinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerin etkisi vardır. Fiziksel faktörler; nem (substratın nemliliği, kurutma hızı, tekrarlayan nem olayı, havadaki nispi nem), sıcaklık, hububatın karıştırılması, mekanik zararlanma, zaman; kimyasal faktörler, CO_2, O_2, substratın kimyasal yapısı, substrata yapılan kimyasal uygulamalar ve gübreleme, ilaçlama gibi kimyasal

işlemler; biyolojik faktörle ise fungal enfeksiyon, inokulum yoğunluğu, bitki dayanıklılığı ve çeşiti, fungus streynleri arasındaki genetik farklılık, mikroorganizmaların değişim ilişkileridir. Özetle fungal gelişme ve mikotoksin üremesi için gerekli olan en önemli faktörler çevresel nem/ sıcaklık, su aktivitesi (a_w), pH ve oksijendir (Tiryaki vd., 2011).

Mikotoksinlerin sağlığa zararlı etkilerine karşı korunma, önleme ya da bu toksinleri uzaklaştırma üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı bir konudur. Detoksifikasyonun etkin, uygulanabilir ve ekonomik olması ülkeler açısından da önemlidir. Halk sağlığını tehdit eden mikotoksinlere karşı üretici ve tüketicinin bilinçlendirilmesi, resmi kontrol mekanizmalarının etkin kullanılması, bu zararlıların önlenmesinde etkili ama toksik olmayan yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. En fazla çaba da hasat ve saklama esnasındaki oluşumun önlenmesi için harcanmaktadır (Sabuncuoğlu vd., 2008). Bazı mikotoksinlerin endotoksin olarak misel içinde biriktiği, birçoğunun ise miselden substrata salgılanıp difüze olduğu da görülmektedir. Yani küflü gıda ve yemlerden miseller uzaklaştırılsa bile mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmamaktadır (Savaş, 2016). Bu nedenle detoksifikasyona yönelik çalışmalar sürekli bir gelişim halindedir (Sabuncuoğlu vd., 2008). Oluşabilecek riskleri azaltmaya ve toksin üremesini durdurmaya yönelik çalışmalarda fiziksel teknikler, doğal ve sentetik kaynaklı kimyasallar ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır (Tosun, 2015; Abedi vd.; 2022).

Fiziksel detoksifikasyon için kullanılan yöntemler; ayırma, temizleme, kabuk soyma (Abedi vd.; 2022), arındırma, mekanik sıralama ve dağılım, yıkama, yoğunluğun gözlenmesi, termal inaktivite, mikrodalga uygulaması da içeren radyasyon uygulaması ve çözücü ekstraksiyonudur (Sabuncuoğlu vd., 2008; Tosun, 2015).

Kimyasal detoksifikasyon kapsamında ozon, alkali hidroliz, amonyum (amonyaklaştırma), bisülfitler gibi çok sayıda işlem gerçekleştirilmiştir (Abedi vd.; 2022). Birçok ülkede alkali ve oksidatif ajanlar gibi kullanılan kimyasal uygulamalar ekonomik olarak fayda sağlamıştır. Ama bu uygulamalar sonucu

mikotoksin miktarının tamamı ya da tamamına yakını azalırken, gıdanın besin değeri kaybolmuş ve bazı ürünler için zararlı hale dönüşmüştür. Ayrıca, Avrupa Birliği kimyasal uygulama metodlarına izin vermemektedir (Tosun, 2015).

Biyololik detoksifikasyon da, OTA 'yı adsorbe etme, dönüştürme veya ayrıştırma yoluyla kontamine ürünleri detoksifiye etmek için mikroorganizmalar kullanılır (Abedi vd.; 2022). Temel amaç mikotoksin aktivitesini durdurmaktır. Mikotoksinlerin enzimatik olarak birçok bakteri ve küf mantarı tarafından deaktif hale geçtiği gösterilmiştir. Bu sayede gıda ve yemlerin lezzeti ve besin değeri bozulmadan toksin detoksifikasyonu sağlanmış olmaktadır (Sabuncuoğlu vd., 2008; Tosun, 2015). Belirli, çevre dostu, verimli, maliyet faydalı ve besleyici kaliteyi koruyan çeşitli avantajlar nedeniyle dekontaminasyon için biyolojik dekontaminasyon yöntemi önerilmektedir (Abedi vd.; 2022). Yapılan bazı çalışmalarda *Bacillus spp.*, laktik asit bakterilerinin ve propiyonik asit bakterilerinin fungal büyümeyi ve mikotoksin üretimini engelleyeceği gösterilmiş ve biyolojik detoksifikasyon alanında önemli rol oynayacağı belirtilmiştir (Bosco ve Mollea, 2012; Savaş, 2016). Laktik asit bakterileri, gıdalarda mantar oluşumunu önleme yetenekleri ve fermentasyon sürecinde dekontaminasyon özlelikleri sergilemeleri nedeniyle 'yeşil koruyucular' olarak adlandırılırlar (Abedi vd.; 2022). Shetty ve Jespersen (2006) yaptıkları araştırmada; *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae)* ve laktik asit bakterilerinin yüzey adsorbsiyonu yoluyla mikotoksinlerin dekontaminasyonuna etkilerini incelemişlerdir. ABD' de gelişmekte olan yer fıstığının toprağına *A. flavus ve A.parasiticus'* un atoksijenik suşlarının eklenmesiyle aflatoksin kontaminasyonu %74.3 ila %99.9 oranda azaldığı gözlemlenmiştir (Tola ve Kebede; 2016).

Maya hücrelerinin ve laktik asit bakterilerinin, hücre duvarı yüzeyindeki komleks bağlanma yapılarında metal iyonlarına ve öldürücü toksinlere bağlandığı bilinmektedir (Shetty ve Jespersen, 2006; Milani ve Heidari, 2017). Protein, polisakkarit ve lipitlerden oluşan hücre duvarları, hidrojen bağları, hidrofobik ya da iyonik etkileşimler gibi farklı bağlanma mekanizmalarına ek olarak kolay erişilebilen ve fazla sayıda tutunma (adsorpsiyon) merkezine sahiptir. Hücre duvarı yüzeyindeki toksinler ve fonsiyonel gruplar arasındaki

fiziksel tutunma, iyon değişimine ve kompleks yapısına bağlı olarak gerçekleşir (Milani ve Heidari, 2017). Piotrowska ve Zakowska (2000) tarafından yapılan bir çalışmada *Lactobacillus (L.)* suşlarından *L. bulgaricus, L. acidophilus* ve *L. helveticus*' un 24 saat inkübasyonu sonrası %94, %70 ve %46 olan OTA içeriğini sırasıyla %54, %50 ve %37'ye kadar kültür ortamından uzaklaştırdığı belirlenmiştir. Laktik asit bakterileri, OTA'nın hücre duvarı tarafından adsorbe edilmesini ve detoksifikasyonda rol oynayan ana mekanizma olmasını sağlamaktadır (Milani ve Heidari, 2017). Piotrowska (2014), yaptığı çalışmada *L. plantarum, L. brevis* ve *L. sanfranciscensis* gibi laktik asit bakterilerinin OTA' yı bağlama kapasitesini incelemiştir. Canlı laktik asit bakterileri hücrelerinin inaktive olmuş laktik asit bakterileri hücrelerinden daha az dekontaminasyon özellik gösterdiği belirlenmiştir. Canlı laktik asit bakterileri hücrelerinin OTA içeriği besi yeri ortamında %16.9 ila %35 ve PBS'de %14.8 ila %26.4 oranında azalmıştır, inaktive olmuş laktik asit bakterileri hücrelerinin OTA' yı %46.2 ila %59.8 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Abedi vd. (2022) yaptıkları çalışmada laktik asit bakterileri ile OTA' nın (10 µg/kg) bağlanma kapasitesi ve stabilitesini araştırmışlardır. Çalışmada canlı, ısı ve ultrasonla inative olmuş laktik asit bakterileri kullanılmış, yüksek sıcaklık veya ultrasonik işlemlerle indüklenen canlı olmayan laktik asit bakterileri hücrelerinin mikotoksin bağlama etkinliklerini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Yani canlı olmayan laktik asit bakterileri suşlarının gıdayla birlikte fermantasyonunun OTA 'yı detoksifiye edebileceğini ve insanları ve hayvanları bu toksinin olumsuz sağlık etkilerine karşı koruyacağı öngörülmüştür. Aynı zamanda, sonuçlar OTA' nın bağlanmasının çok sayıda faktöre, yani suş, toksin seviyesi, hücre hidrofobikliği, pH değeri ve bakteri canlılığı gibi birçok faktöre bağlı olduğunu göstermiştir.

Mikotoksinlere maruz kalma, yutma, soluma ve deri teması yoluyla meydana gelebilir ve neredeyse her zaman tesadüfidir ama temel kaynağı beslenmeyle gerçekleşir (Bosco ve Mollea, 2012). Mikotoksinlerin tüketimi sonrasında insan ve hayvanlarda görülen toksin zehirlenmelerine "mikotoksikozis" denir. Bu durum, toksinin kimyasal formülasyonuna, toksine maruz kalma süresine, kişinin yaşına, toksinin kimyasal etkileşimine bağlı olarak ortaya çıkar.

İnsanlarda iki farklı şekilde oluşabilmektedir. Mikotoksin içeren gıdayı doğrudan tüketmekle "birincil mikotoksikozis" gerçekleşir. Hayvanlar tarafından mikotoksin içeren yemlerin tüketilmesi sonucu et, süt, yumurta gibi hayvansal gıda maddelerinin insanlar tarafından beslenme amaçlı kullanımıyla "ikincil mikotoksikozis" ortaya çıkar (Tosun, 2015; Savaş, 2016). Mikotoksinler insanlara kontamine olmuş gıdalar ve kontamine yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen hayvansal ürünler aracılığıyla kalıntı düzeyinde de olsa bulaşmaktadır. Az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde gıdaların %25' inin toksin veya metabolitleriyle kontamine olduğu görülmüştür. Genellikle gıdanın tüketilmesiyle vücuda alınsa da doğrudan deri ile teması ve toksik sporların nefes yoluyla solunumu sonucunda da bulaşı gerçekleşir (Yentür ve Er, 2012).

Her ülkenin limit değerleri farklı olsa da insanları mikotoksinlerin toksik etkilerinden korumak amacıyla tolere edilebilir en yüksek yasal miktarları belirlenmiştir. Uluslararası ticarette de bu limitleri aşamamak için içinde çaba sarfedilmektedir. Global açıdan her ülke coğrafi konumuna göre uluslararası kabul gören limitleri dikkate almaktadır. Bunlar arasında, TGK, Kodeks Alimentarius, Avrupa Birliği EC NO 1881/2006 direktifi limitleri sayılabilmektedir (Tiryaki vd., 2011).

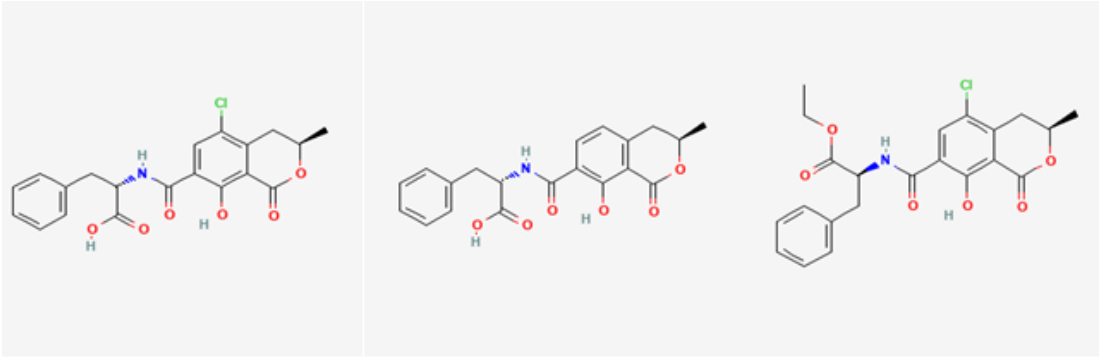
2.2. Okratoksin

En önemli mikotoksinlerden biri olan okratoksinler *Aspergillus* ve *Penicillium* küfleri tarafından üretilmekte olup 10'dan fazla türü bulunmaktadır. OTA, Okratoksin B (OTB) ve Okratoksin C (OTC) olmak üzere kimyasal yapıları birbirinden farklılık gösteren gruplardan oluşmaktadır. Aralarında en çok tespit edilen cinsi ve en toksik özellikli olanı OTA'dır. (El Khoury ve Atoui, 2010; Algül, 2012; Ünüsan, 2019). OTA ve ondan daha az toksik etki gösteren dekloro analoğu OTB ilk kez Güney Afrika'lı kimyacılar tarafından yeni metabolitleri tanımlamak için özel olarak tasarlanmış metabolit taraması sırasında 1965 yılında tanımlanmış, D.B. Scott tarafından sorgum tanelerinden izloe edilmiş,

Aspergillus ochraceus' un K-804 suşundan izole edilmiştir (Karagözlü ve Karapınar, 2000; Bennett ve Klich, 2003; Algül, 2012; Koç, 2016).

OTA, kristal formda, $C_{20}H_{18}ClNO_6$ formülasyonuna sahip, 403.82 g/mol moleküler ağırlığına sahip, ışık varlığında çok kararsız ancak ısıya oldukça dayanıklı, beyaz renkte, suda az çözünen fakat sodyum bikarbonatlı çözeltilerde çözünebilen, zayıf asidik özellikli, ultraviyole ışık altında asit ve alkali çözeltide sırasıyla yeşil ve mavi floresans yayan, erime noktası 336^0F- 169^0C olan bir bileşiktir (El Khoury ve Atoui, 2010; Algül, 2012; Kaya, 2012; Tosun, 2015; Savaş, 2016; Pubchem, 2022). Kimyasal formülü L-fenilanin-N-[(5-kloro-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-metil-1-okso-1H-2benzopiran-7-il)karbonil]-(R) -izokumarin' dir. Yapısal olarak da L- fenilalanin, klorür ve hidroksil içeren dihidroizokumarinin bir kısmını içeren para-klorofenolik gruptan oluşmaktadır (Cecchini vd., 2006; Bosco ve Mollea, 2012; Tosun, 2015; Koç, 2016; Büyüker, 2019; Yu vd. 2020). Hububat ürünlerinin 121^0C sıcaklık ve 1 atm basınç altında 3 saat tutulmaları halinde OTA' nın etkinliği %35 oranında devam etmektedir (Gürhayta ve Çağındı, 2015).

OTB, OTA'nın daha az toksik olan klorsuz türevidir. Molekül ağırlığı 369.4 g/mol, erime noktası 430^0F- 221.1^0C, formülü $C_{20}H_{19}NO_6$ ' dır. OTB, L-fenilalaninin amino grubunun L-Fenilalanin, N-[[(3R)-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-metil-1-okso-1H-2-benzopiran-7-il]karbonil]- karboksi grubu ile yoğunlaşmasından kaynaklanan bir fenilalanin türevidir. OTC, $C_{22}H_{22}ClNO_6$ formülüne sahip, 431.9 g/mol molekük ağırlıklı, OTA' nın etil esteri bir fenilalanin türevidir (Pubchem, 2022). OTA ile OTB' nin farkı, OTA' nın dihidro-metil- isokumarin halka sisteminde C5 pozisyonunda klor atomu taşımasıdır. Bu klor atomunun varlığına ilave olarak fenolik hidroksil grubuda toksisiteyi arttırmaktadır (Girgin vd., 2001). Kısacası klorür içermeyen türevi OTB, etil ester türevi ise OTC' dir. Bu iki okratoksin türevi gıdalarda düşük konsantrasyonlarda bulunduklarından fazla önem taşımazlar (Tosun, 2015). OTA'nın izokumarik türevi, Okratoksin α ve onun dekloro analoğu, Okatoksin β, OTA' nın metabolitleri olarak bildirilmişlerdir. (El Khoury ve Atoui, 2010). OTA, OTB ve OTC' nin moleküler yapısı Şekil 2.1' de gösterilmiştir.



Okratoksin A Okratoksin B Okratoksin C

Şekil 2.1. OTA, OTB ve OTC' nin moleküler yapısı (Pubchem, 2022)

Okratoksinlerin kimyasal yapılarında bulunan dihidroizokumarin ve fenilalanin bileşikleri, birbirlerine amid bağı ile bağlanırlar bu da ısıya ve hidrolize karşı çok kararlı bir yapı kazanmalarına neden olur (Çelik, 2008). Bu kararlı hal nedeniyle tüketiciye sunulan gıda maddelerinde herhangi bir değişime uğramadan varlığını sürdürebilir. Bu süreçler kaynatma, fermentasyon, pişirme, kızartma, sıcaklık uygulama ve pH değişikliğidir. OTA' nın yoğurma, fermentasyon, pişirme yani ekmek üretimi sırasında kısmen de olsa azaldığı görülmüştür (Tosun, 2015).

OTA, *Penicillium* cinsi küfler tarafından ılıman ve soğuk bölgelerde, *Aspergillus* cinsi küfler tarafından yüksek sıcaklık ve nemin görüldüğü tropikal ve alt tropikal bölgelerde üremektedir (Duarte vd., 2010a; Bosco ve Mollea, 2012; Ünüsan, 2019). OTA, başta *A. ochraceus, A. carbonarius, A. niger* ve *P. verrucosum* olmak üzere çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilmektedir (Oruç, 2006; Juan, 2007; İngök ve Güler; 2015).

Okratoksin oluşturan küfler ve türleri Çizelge 2.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Okratoksin oluşturan küfler

***Aspergillus* cinsi küfler**	**Kaynak**
A. auricomus	(Bennett ve Klich, 2003; Büyüker, 2015)
A. flocculosus	(Büyüker, 2015)
A. melleus	(Bennett ve Klich, 2003; Tiryaki vd., 2011)
A. ochraceus	(De Grone, 1996; Cecchini vd., 2006; Botton vd., 2008; Çelik, 2008; Tiryaki vd., 2011; Kaya 2012; İngök ve Güler, 2015; Tosun, 2015 ; Yu vd., 2020; Ürkek ve Şengül, 2022)
A. ostianus	(Çelik, 2008; Tiryaki vd., 2011;Bosco ve Mollea, 2012)
A. persii	(Bosco ve Mollea, 2012)
A. petrakii	(Bosco ve Mollea, 2012)
A. sclerotiorum	(Tiryaki vd., 2011; Büyüker, 2015; Gürhayta ve Çağındı, 2015)
A. steynii	(Bosco ve Mollea, 2012; Ürkek ve Şengül, 2022)
A. sulphureus	(Tiryaki vd., 2011; Büyüker, 2015; Gürhayta ve Çağındı, 2015)
A. wentii	(Girgin vd., 2001; Tiryaki vd., 2011)
A. westerdijkiae	(El Khoury ve Atoui, 2010; Bosco ve Mollea, 2012; Ürkek ve Şengül, 2022)
A. alliaceus (Petromycesalliaceus)	(Bennett ve Klich, 2003; Tiryaki vd., 2011; Ürkek ve Şengül, 2022)
A. albertensis (Petromycesalbertensis)	(Tiryaki vd., 2011; Büyüker, 2015)
A. carbonarius	(Bennett ve Klich, 2003; Cecchini vd., 2006; Botton vd., 2008; El Khoury ve Atoui, 2010; İngök ve Güler, 2015; Tosun, 2015; Yu vd., 2020; Ürkek ve Şengül, 2022)
A. lacticoffeatus	(El Khoury ve Atoui, 2010; Büyüker, 2015)
A. niger	(Botton vd., 2008; Çelik, 2008; Tiryaki vd., 2011; Yu vd., 2020)
A. sclerotioniger	(El Khoury ve Atoui, 2010; Büyüker, 2015; İngök ve Güler, 2015)
A. paraciticus	(Erzurum, 2001)
A. glaucus	(Bennett ve Klich, 2003)
***Penicillium* cinsi küfler**	
P. nordicum	(Bosco ve Mollea, 2012; Ürkek ve Şengül, 2022)
P. verrucosum	(De Grone, 1996; Erzurum, 2001; Cecchini vd., 2006; Bosco ve Mollea, 2012; Kaya 2012; İngök ve Güler, 2015; Tosun, 2015; Yu vd., 2020; Ürkek ve Şengül, 2022)
P. citrinum	(Çelik, 2008)
P. viridicatum	(Tiryaki vd., 2011)
P. cyclopium	(Tiryaki vd., 2011)
P. frequentans	(Tiryaki vd., 2011)
P. nidulans	(Tiryaki vd., 2011)

OTA oluşumu sadece hammaddelerle sınırlı değildir, aynı zamana mikotoksinin termostabilitesi nedeniyle işlenmiş ürünlerde de görülebilir (Duarte vd., 2010a). OTA tahıl ürünlerinde, kakao, kahve çekirdeği, kurutulmuş meyveler, şarap, bira, üzüm suyu, baharatlar (Avrupa Komisyonu, 2002), yeşil ve kavrulmuş

kahve ürünleri, kurutulmuş asma meyveleri (Avrupa Komisyonu, 2005), meyankökü gibi ürünlerde bulunabilmektedirler (Avrupa Komisyonu, 2022).

Tahıl tanelerinde OTA 'nın üretimi ve oluşumunun her şeyden önce tahılın hasattaki durumuna, tahılın ne kadar dikkatli kurutulduğuna ve depolama tesislerinin kalitesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Kuzey ve Batı Avrupa, Kanada ve diğer ılıman bölgelerdeki belirli durumlarda, tahıllar OTA oluşumu için daha büyük risk altındadır, çünkü tahıl genellikle yüksek nem içeriğinde, bazen %20'nin üzerinde hasat edilir. Bu tür tahıllarda OTA oluşumu, kurutmadan önce yetersiz kurutma veya aşırı uzun depolamaya bağlanmaktadır. Uygun koşullar, örneğin yüksek su içeriğiyle hasat edilen tahıllar, verimsiz kurutma veya nemli koşullar altında depolama gibi koşullar göz önüne alındığında, tahıllarda yüksek OTA seviyeleri oluşabilir. Örneğin dünya çapında en önemli mahsullerden biri olan pirinç, bir su bitkisidir ve genellikle %35 ile %50 arasındaki çok yüksek nem seviyelerinde hasat edilir. Sonuç olarak, mikotoksin üreten küfler veya sporlar, tarlada ve hasatta pirinç ekinlerini enfekte edebilir. Enfekte tahıl daha sonra zaten depoda olan ürünleri kontamine edebilir ve çevresel koşullar uygunsa OTA üretilecektir (Duarte vd., 2010a).

Küf enfeksiyonunun tüm kaynaklarını tamamen ortadan kaldırmak imkânsız olsa da, küf oluşumuna neden olan bazı özel koşulları azaltmak ve hatta önlemek mümkündür. Basit bir ifadeyle, tahıl %15'in altında kurutulmalı (yaklaşık 0.8' lik bir a_w) ve depolama boyunca bu seviyede tutulmalıdır. Kurutmadaki gecikmeler tahılı riske sokar ve bu da depolama sırasında sonraki sorunlara yol açabilir (Duarte vd., 2010a).

OTA gelişiminde bitkisel üretimde yer alan tarım uygulamalarının türü de belirleyici rol oynamaktadır. Juan vd. (2008a), İspanya ve Portekizden topladıkları 83 adet organik ve konvansiyonel tahıl ve tahıl ürünlerinin (pirinç, buğday, arpa, çavdar, yulaf ve mısır) OTA düzeylerini incelemişlerdir. OTA örneklerin %22’ sinde, 0.20 ila 27.17 ng/g arasında değişen konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Ayrıca araştırmalar sonucunda organik ürünlerin % 72’ sinin

OTA kontaminasyonuna uğradığı ve ortalama değerin 1.64 ng/g olduğu, buna rağmen konvansiyonel ürünlerin %28' inin kontamine olduğu ve ortalama 0.05 ng/g konsantrasyonda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu da organik tahıl ve tahıl ürünlerinin yüksek kontaminasyona uğrayabileceğinin bir göstergesidir. Yine Osnaya vd. (2007), İspanya' da 74 adet konvansiyonel ve 26 adet organik ekmek olmak üzere çeşitli fırınlardan temin edilen numunelerde OTA araştırması yapmış, konvansiyonel ekmeklerin OTA miktarı %20.3' ken, organik ekmeklerde bu miktar % 23 olarak bulunmuştur. Toplumlarda organik tarım uygulaması sonucu üretilen gıdaların daha sağlıklı ve besleyici olduğu algısı vardır. Ancak; tarımsal ilaç kullanılmaması veya yetersiz düzeyde kullanılması nedeniyle mikotoksin içerme olasılığı yüksek olduğu ve gıda güvenliği açısından sorun yaratacağı unutulmamalıdır (Ürkek ve Şengül, 2022).

Çeşitli çalışmalardan OTA 'nın karserojen, nefrotoksik, immünotoksik, teratojenik, muhtemel nörotoksik hepatotoksik ve genotoksik olduğu bildirilmiştir (Avrupa Komisyonu, 2005). Halk sağlığı açısından yarattığı sorunlar nedeniyle IARC tarafından kanserojenik potansiyeline göre sınıflandırılan bazı önemli mikotoksinler Çizelge 2.2' de verilmiştir (IARC, 2022).

Çizelge 2.2. Kanserojenik potansiyele göre bazı mikotoksinler (IARC, 2022)

CAS Numarası	**Mikotoksin**	**Grup[1]**	**Yıl**
303-47-9	Okratoksin A	2 B	1993
10048-13-2	Sterigmatosistin	2 B	1987
116355-83-0	Fumonisin B1, fumonisin B2 ve fusarin C	2 B	1993
1402-68-2	Aflatoksin	1	2012
518-75-2	Sitrinin	3	1987
90-65-3	Penisilik Asit	3	1987

[1]: Grup 1: insanlarda kansere neden olan, Grup 2B: insalarda olası kanserojenik, Grup 3: insanlarda kanserojenik etkeni olmayan

Hayvanlarla yapılan çalışmalar OTA' nın hedef organ olarak böbrekleri seçtiğini göstermiş, hayvanların yanı sıra insanları da etkileyen çeşitli böbrek hastalıklarından sorumlu olduğuda bildirilmiştir (Gürhayta ve Çağındı, 2015; İngök ve Güler, 2015). OTA, gıdalar sayesinde oral yolla vücuda alındığında

dokularda birikmeye sebep olur ve OTA serum yarılanma ömrünün 35 gün (840 saat) olduğu belirtilmiştir (Koç, 2016; Savaş, 2016). Buna karşın hayvanlarda bu yarılanma süresinin farelerde 1-1.5 gün, sıçanlarda 2-5 gün, domuzlarda 3-5 gün, maymunlarda yaklaşık 20 gün olarak bildirilmiştir (Tosun, 2015). Bulgaristan, Romanya' nın kırsal kesimlerinde yaşayan insanlarda interstisyel nefropati hastalığının yüksek miktarda OTA maruziyetiyle oluştuğu düşünülmektedir. Balkan Endemik Nefropatisi (BEN) olarak isimlendirilen bu hastalık ilk kez 1950'lerde tanımlanmıştır. OTA, BEN görülen kasabalardan alınan yiyecek örneklerinde ve kasabada yaşayan insanların kan örneklerinde, hastalık olmayan yerlerde yaşayan insanlara kıyasla daha fazla tespit edilmiştir (Duarte vd., 2010a; Bosco ve Mollea; 2012). Aynı zamanda Tunus' taki nüfusu etkileyen Tunus Nefropatisinin (TCIN) başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir (El Khoury ve Atoui, 2010; Bosco ve Mollea; 2012).

Uzun çalışmalar sonrası birçok ülke mikotoksinler için çeşitli maksimum tolere edilebilir seviyeler ve kılavuz seviyeler belirlemiştir. Aflatoksin gibi bazı toksinlerin seviyeleri sabitlenmiş, ama OTA'nın, patulin, fumonisin gibi toksinlerin seviyesi hala tartışılmaktadır. JECFA, 1991 yılında domuz nefropatileri veri tabanına göre geçici tolere edilebilir haftalık miktarı 112 ng/kg vücut ağırlığı olarak önermiştir. Bununla birlikte 1995 yılında yeniden değerlendirilen haftalık miktar 100 ng/kg vücut ağırlığı (14 ng/kg vücut ağırlığı/gün'e eşittir) olarak değiştirilmiştir. JECFA, Şubat 2001' deki 56. toplantısında OTA'nın nefrotoksisiteyi ve karsinojenisiteyi indüklediği mekanizmanın daha detaylı incelenmesi için çalışma tavsiye etmiş aynı zamanda önceden belirlenen haftalık miktar 100 ng/kg değeri değiştirilmemiştir. Bunun yanında, Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi' nin 1998'de yılında belirlediği günlük OTA alım miktarı 1.2-14 ng/kg vücut ağırlığıdır. Bebek ve çocuklar gibi özel gruplara daha çok önem verilmesi gerektiği belirtilmiştir (El Khoury ve Atoui, 2010). EFSA, 2006 yılında, haftalık alınacak maksimum miktarı 120 ng/kg olarak belirlemiştir. 2020 yılında gıdalardaki OTA hakkındaki bilimsel görüşün bir güncellemesini kabul ederek, OTA için sağlık temelli bir kılavuz değer oluşturmanın uygun olmadığını ve 2006 yılında Otorite tarafından belirlenen 120 ng/kg vücut ağırlığı Tolere

Edilebilir Haftalık Alımının sonuç olarak artık geçerli olmadığını açıklamıştır (Avrupa Komisyonu, 2022).

Avrupa Komisyonu (EC)' nun 12 Mart 2002 tarihli 472/2002 sayılı komisyon direktifinde OTA' nın maksimum seviyeleri belirlenmiştir. Direktife göre bu OTA seviyeleri işlenmemiş çiğ tahıl ve tahıl tanelerinde 5 µg/kg, işlenmiş ve insan tüketimine sunulmuş tüm tahıl ürünlerinde 3 µg/kg, kurutulmuş şarap meyvelerinde (kuru üzüm gibi) 10 µg/kg' dır (Avrupa Komisyonu, 2002).

13 Nisan 2004 tarihli, EC 683/2004 sayılı komisyon direktifinde; bebekler ve çocuklar için OTA riskinin çok fazla olduğu düşünülmüş, bebek mamaları, bebek ve çocuklar için işlenmiş tahıl bazlı gıdalarda maksimum limit 0.5 µg/kg belirlenmiş, yine özellikle bebekler için tıbbi amaçla kullanılan gıda ürünleri de bu miktara dahil edilmiştir (Avrupa Komisyonu, 2004).

26 Ocak 2005 tarihli EC 123/2005 sayılı komisyon direktifinde, tahıllar için oluşturulan maksimum limitler değiştirilmezken, üzüm suları, şaraplar ve şıradaki miktar 2 µg/kg olarak, çözünür kahve hariç kavrulmuş kahve çekirdekleri ve öğütülmüş kavrulmuş kahve 5 µg/kg, çözünür kahve 10 µg/kg belirlenmiştir (Avrupa Komisyonu, 2005).

19 Aralık 2006 tarihli EC 1881/2006 sayılı komisyon direktifinde, kuru baharatlar dahil (meyveleri, beyaz ve karabiber dahil), hindistan cevizi, zencefil, zerdeçal 15 µg/kg, kırmızı biber ve biber tozu 20 µg/kg, meyan kökü ekstresi 80 µg/kg, tüketiciye doğrudan satılmayan buğday glüteni 8 µg/kg maksimum limitler belirlenmiştir (Avrupa Komisyonu, 2006b).

5 Şubat 2010 tarihli EC 105/2010 sayılı komisyon direktifinde yeniden değerlendirmeler yapılmış, maksimum limitler; baharat grubunda, kırmızıbiber, beyaz biber ve karabiber 30 µg/kg, hindistan cevizi, zencefil, zerdeçal 15 µg/kg olarak güncellenmiştir (Avrupa Komisyonu, 2010).

5 Ağustos 2022 tarihli EC 1370/2022 sayılı komisyon direktifinde EC 1881/2006 sayılı tüzüğün güncellenmesine ve bazı ürünlerin maksimum limitlerinin değiştirilmesine ve listeye yeni ürünler eklenmesine karar verilmiştir. Bu ürünler; yağlı tohum, kuruyemiş veya kuru meyve içermeyen ürünler 2 µg/kg, en az %20 kuru asma meyvesi ve/veya kuru incir içeren ürünler 4 µg/kg, yağlı tohumlar, sert kabuklu yemişler ve/veya kuru meyve içeren diğer ürünler 3 µg/kg, alkolsüz malt içecekler 3 µg/kg, kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm) ve kuru incir 8 µg/kg (daha önce 10 µg/kg), diğer kuru meyveler 2 µg/kg, hurma şurubu 15 µg/kg, kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve (çözülebilir kahve hariç) 3 µg/kg (daha önce 5 µg/kg), çözünür kahve (hazır kahve) 5 (daha önce 10 µg/kg), kırmızı biber 20 µg/kg, kuru maddede %97'den fazla meyan kökü ekstresi içeren şekerlemeler 50 µg/kg, diğer meyan kökü şekerlemeleri 10 µg/kg, ayçiçeği çekirdeği, kabak çekirdeği, karpuz/kavun çekirdeği, kenevir tohumu, soya fasulyesi 15 µg/kg, nihai tüketici için piyasaya arz edilmeden veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce tasnif veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak fıstıklar 10 µg/kg, nihai tüketici için piyasaya arz edilen veya gıda maddelerinde bileşen olarak kullanılan antep fıstığı 5 µg/kg, kakao tozu 3 µg/kg olarak belirlenmiştir. Alınan kararların 1 Ocak 2023 tarihinden itibaren geçerli olacağı belirtilmiştir (Avrupa Komisyonu, 2022).

Ayrıca EC, 466/2001 yönetmeliğinde, OTA' nın kontaminasyon seviyelerini düşürmek için limitleri uygun olmayan ürünlerin uygun olan ürünlerle karıştırılmasını yasaklamıştır. İnsan tüketimine sunulacak ürünlerde OTA dekontaminasyonu için kimyasal kullanımına da yasak getirmiştir (El Khoury ve Atoui, 2010).

Avrupa Komisyonu, peynir ve jambon için maksimum limit belirlemeden önce OTA varlığının izlenmesine karar vermiştir (Avrupa Komisyonu, 2022). Ancak bazı ülkeler; Danimarka (domuz böbreği: 10 µg/kg), Estonya (Domuz karaciğeri: 10 µg/kg), Romanya (Domuz böbreği, karaciğeri ve eti: 5 µg/kg), Slovakya (et ve süt: 5 µg/kg) şeklinde belirlemişlerdir. OTA' nın hayvansal

gıdalarda varlığına yönelik etkili çalışmaların yapılması gerekmektedir (Keyvan ve Yurdakul; 2015).

Tahıllarda bulunabilecek maksimum OTA miktarı İsviçre' de 2 µg/kg, Hollanda' da 3 µg/kg (Savaş, 2016), Çin, Fransa ve Avusturya' da 5 µg/kg, İngiltere' de 10 µg/kg (Savaş, 2016), İsrail' de 50 µg/kg olarak kabul edilmiştir. Şu anda FDA, gıda ve yemlerde OTA için düzenleyici yönergeler belirlememiştir (Yu vd., 2020)

Ülkemizde 1997 yılında 23172 sayılı Resmi Gazate ile yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde mikotoksinlerden yalnızca aflatoksinler, patulin ve ergot alkaloidleri için limit değerlere yer verilmiştir (23172 sayılı Resmi Gazete, 1997). 2002 yılında 2002/63 numaralı 'Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ' ile işlenmemiş tahıl taneleri, tahıl bazlı işlenmiş ürünler ve kuru üzüm de OTA için maksimum seviye belirlenmiştir (24885 sayılı Resmi Gazete, 2002). 17 Mayıs 2008 tarihli 2008/26 numalı tebliğde OTA limitleri yeniden belirlenmiş (26879 sayılı Resmi Gazete, 2008), sonrasında bu tebliğ yürürlükten kaldırılarak yerine 29 Aralık 2011 tarihli 28157 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan 'TGK Bulaşanlar Yönetmeliği' uygulanmaya başlamıştır (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011). 19 Aralık 2012 tarihinde 28502 sayılı yönetmelikle bazı ürünlerin OTA miktarları değiştirilmiş ve listeye yeni ürünler eklenmiştir (28502 sayılı Resmi Gazete, 2012). TGK Bulaşanlar Yönetmeliği Ek -1 Bölüm 2'de OTA için belirtilen 'müsade edilen en yüksek değerler' Çizelge 2.3' deki gibidir.

Çizelge 2.3. OTA'nın tahıllarda bulunabileceği maksimum limitler (TGK, 2012)

Gıda	**Okratoksin A maksimum limit (µg/kg)**
İşlenmemiş tahıllar	5
(Değişik:RG-19/12/2012-28502) İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3
Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm)	10
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5
Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve	10
Şarap ve meyve şarapları (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az %15 olan şaraplar hariç)	2
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli	2
Üzüm suyu, konsantreden üretilen üzüm suyu, üzüm nektarı, üzüm şırası ve konsantreden üretilen üzüm şırası (doğrudan tüketimine sunulan)	2
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,5
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdala	0,5
(Değişik:RG-19/12/2012-28502) Baharat (Kurutulmuş baharat dahil) Karabiber (Piper spp.) (Bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) Hintcevizi/Muskat (Myristica fragrans) Zencefil (Zingiber officinale) Zerdeçal (Curcuma longa) Kırmızıbiber (Capsicum spp.) (Bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) Bu satırda belirtilen baharatın bir tanesini içeren karışım baharat	15
Meyan kökü	20
Meyan kökü ekstraktı	80
(Ek:RG19/12/2012-28502) Buğday gluteni (tüketiciye doğrudan satılmayan)	8

OTA için limit belirlemenin amacı, uluslararası ve ulusal çapta insanların güvenli gıdaya ulaşmasının sağlanması, kontamine ürün varlığının tespit edilip en aza indirilmesi ve iyi tarım uygulamalarının uygun şekillerde yapılmasının sağlanmasıdır (El Khoury ve Atoui, 2010).

RASSF (Rapid Alert System for Food and Feed), 1979 yılında Avrupa Birliği üyesi ülkelerin ve Norveç, Lihtenştayn, İzlanda ve İsviçre arasında gıda ve yem ürünleri içerisinde sağlık tehditlerine karşı daha hızlı ve koordineli şekilde hareket edilmesini sağlayan, ortaya çıkan uygunsuzlukların portal üzerinden yayınlandığı bir araçtır (Sağlam ve Masatcıoğlu, 2020). RASSF portalı, aranabilir bir çevrimiçi veritabanına sahiptir. Yayınlanan bildirimler içerisinde ülke adı, menşei ülke adı, tarih, uygulanacak işlem (sınır reddi bildirimi, uyarı bildirimi, dikkat için bilgi bildirimi gibi), risk kararı (ciddi, kararsız gibi) gibi bilgilere ulaşılabilir. 2022 yılı (1 Ocak-1 Kasım) içerisinde yapılan 454 bildirimin 19 tanesini OTA bildirimi oluşturmaktadır (RASSF, 2022).

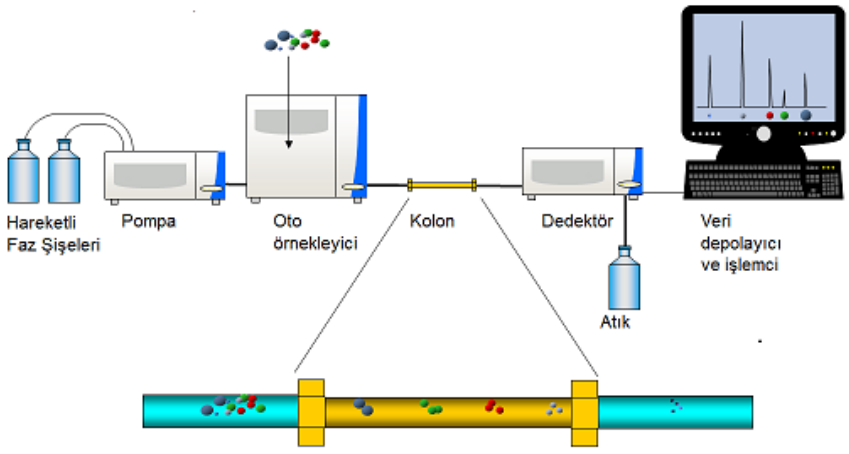
Mikotoksinlerin keşfinden sonra araştırmacılar toksin tespitini sağlayacak analiz yöntemleri üzerinde çalışmalara yoğunlaşmışlardır. Mikotoksinlerin tespitinde 3 önemli konu dikkat çekmiştir. Birincisi; toksinlerin kimyasal yapılarının fiziksel ve kimyasal farklılıklarından dolayı bireysel metodların geliştirilmesi, ikincisi; ekstraksiyon işleminin etkili şekilde yapılabilmesi, üçüncüsü de; gıdalarda homojen dağılım göstermeyen toksinlerin etkin örnekleme yapılarak ayrıca analiz hassasiyetini ve kesinliğini artırmak için yeterli sayıda test uygulanmasıdır (Var vd., 2004).

Mikotoksinler, komleks kimyasal yapıya sahip organik materyallerde mg/kg, µg/ kg gibi düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Kompleks yapıdaki bu materyallerden mikotoksinlerin doğru şekilde tespitinin yapılabilmesi için şu işlem basamaklarından geçmesi gerekir. Örnekleme, homojenizasyon, ekstraksiyon, clean-up ve örneğin konsantrasyonu. Nihai ayrıştırma kromotografik teknikler veya immunokimyasal metotlarla yapılır. Kromotografik teknikte çok sayıda analit ayrıştırılabilirken, immunokimyasal metodlarda her mikotoksine özgü antibadi gerekir (Tiryaki vd., 2011; Savaş, 2016).

Mikotoksin analizlerinde; ince tabaka kromotografisi (Thin Layer Chromatography, TLC), yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC), gaz kromotografisi/ kütle spektrometresi

(GC/MS), enzim bağlanmış immunoabsorbant yöntemi (ELISA), radio-immunassay (RIA) ve enzim aktivitesine bağlı immunoteknik (Enzyme Multiplied Immunatechnique/EMIT) (Oruç, 2006), polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction/PCR) (Hayat vd., 2012) yöntemleri kullanılmaktadır (Tiryaki vd., 2011; Algül, 2012; Keyvan ve Yurdakul, 2015; Öksüztepe ve Erkan, 2016; Açu ve Ocak, 2019; Iqbal, 2021).

HPLC, sıvı kromatografi ayırma tekniğidir (Algül, 2012). Sıvı kromotografisi, kolonlara ve düzlemsel yüzeylere uygulanabilen bir kromatografi çeşididir. Sıvı kromatografisi metodunun özel bir uygulaması olan HPLC, hareketli fazda çözünebilen bir kimyasal karışımın kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabildiği oldukça hassas bir yöntemdir. HPLC sisteminin kısımları Şekil 2.2'de ki; pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır (Anonim, 2022a). Kromatografik analiz işlemi kolona örneğin enjeksiyonu ile başlar. Örnek hareketli faz ile kolon boyunca geçer ve kolon içerisinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Kolon çıkışında ayrılan bileşenlerin herbiri için sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamına kromatogram adı verilir (Koç, 2019).



Şekil 2.2. HPLC sisteminin şematik görüntüsü (Anonim, 2022a)

HPLC' de (LC) hareketli faz sıvı (asetonitril, metanol, etanol, terahidrofuran, etil asetat, su gibi solventler) ve sabit faz çok küçük katı parçacıklardan (kolonun

dolgu maddeleri olan silisyum dioksit, aliminyum oksit, gözenekli polimer ve iyon değiştiriciler gibi) oluşmaktadır. OTA analizinde kullanılacak olan HPLC' de FLD kullanılır (Oruç, 2006; Tiryaki vd., 2011). Mikotoksin belirlemede daha ucuz ve daha kesin spektroskopik algılama söz konusu olduğunda, özellikle de numune hazırlama seçici olduğunda FLD ile donatılmış HPLC en uygun yöntem olarak kullanılır. Bu nedenle AOAC ve Avrupa Standardizasyonu gıda ve yemlerdeki mikotoksinler için HPLC/FLD 'yi içeren birçok resmi veya standart kantifikasyon yöntemini benimsemiştir (Iqbal, 2021). OTA analizinde temelde C-18 kolon ve mikotoksinlerin ekstraksiyon aşamasında toksinlerin daha konsantre ve saf olarak elde edilebilmesi için Immüno Affinite Kolon (IAK) kullanılmalıdır (Oruç, 2006; Tiryaki vd., 2011).

Çeşitli gıda maddelerinde OTA analizi için resmi/ doğrulanmış metotlar bulunmaktadır. TLC ile yapılan iki yöntem dışında bütün doğrulanmış yöntemlerde flouresans dedektörlü sıvı kromatografisi temel alınmıştır. ELISA test kitleri tarama amaçlı kullanılabilmektedir. Fakat doğrulama için sıvı kromatografisine ihtiyaç duyulmaktadır. HPLC/ FLD, yapılan ekstraksiyonların çoğunda performansın yüksek olması, kesinlik, doğruluk, hassasiyet ve yeniden üretilebilirlik sağlayan Immüno Affinite Kolon kullanılması nedeniyle OTA belirlemede en çok kullanılan yöntemdir (Çelik, 2008).

2.3. Buğday ve Diğer Ürünler Üzerine Yapılan OTA Çalışmaları

Osborne (1980), 7 adet küflü un numunesinde TLC ile OTA taraması yapmıştır. OTA varlığını HPLC ile doğrulamıştır. OTA iki küflü un numunesinde 0.49 ve 2.9 µg/kg konsantrasyonda bulunmuştur. Küflü un örneklerinden birinde sitrinin de tespit edilmiş, ancak miktar olarak ölçülemeyecek kadar düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir.

Boudra vd. (1995) tarafından yapılan bir araştırmada, OTA ile kontamine olmuş buğdayın; farklı sıcaklık ve nem koşullarındaki stabilitesi incelenmiş, 100^0C'de 40-160 dakika kuru ısıtılmasının OTA içeriğini değiştirmediği, yine 100^0C'de de

ıslak ısıtma uygulandığında 120 dakikadan sonra OTA' nın %50'sinden fazlasının yok olduğu tespit edilmiştir.

Trucksess vd. (1999) 'nin buğday, arpa ve kahvede bulunan OTA üzerine yaptıkları çalışmada 383 buğday numunesini 56 tanesinde, 103 arpa numunesinin 11 tanesinde, 19 yeşil kahve örneğinin 9 tanesinde, 13 kavrulmuş kahve numunesinin 9 tanesinde OTA tespit edilmiştir. 4 buğday numunesiyle ve 1 arpa numunesinin OTA miktarının limitlerin üzerinde bulunduğu, kahve çekirdeklerinin ise >5 ng/g miktarı geçmediği belirlenmiştir.

Karagözlü ve Karapınar (2000), yulaf gevreği, unu ve ezmesi, mısır ve mısır unu, aşurelik buğday ve müsliden oluşan toplam 100 adet tahıl ürününde OTA araştırması yapmıştır. 1 adet aşurelik buğday, 1 adet yulaf ezmesi ve 2 adet mısır örneğinde miktar olarak toplam 0.27-9.84 ppb (µg/kg) düzeyleri arasında değişen OTA' ya rastlanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, ürünlerde bulunan OTA' nın herhangi bir tehlike oluşturmadığı ancak OTA' yla ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Abdulkadar vd. (2004) Katar pazarından 106 adet çeşitli üründe (tahıl ve tahıl ürünleri, sert kabuklu yemişler ve fındık ürünleri, baharatlar, kuru meyveler ve içecekler) mikotoksin yükü tespiti yapmışlardır. Bu çalışmaya göre 106 numuneden 11'inin OTA seviyesi 0.20-4.91 µg/kg aralığındadır. OTA pirinç, karışık baharatlar, kırmızı toz biber, üzüm, hazır kahve ve alkolsüz bira örneklerinde belirlenmiş olup, en yüksek OTA seviyesi kırmızı toz biberde 4.91 µg/kg olarak tespit edilmiştir.

Çelik (2008), Adana ilinde marketlerde satılan kuru üzüm numunelerinde OTA varlığını araştırmıştır. Çalışmada HPLC cihazı kullanılarak analizler yapılmış, analiz edilen 40 adet kuru üzüm örneğinin 26 tanesinde 0.38- 20.90 µg/kg konsantrasyonlarda OTA bulunmuştur.

Ng vd. (2009) Kanada genelinde 2004-2006 yılları arasında 274 adet kuru makarna numunesinde OTA varlığını araştırmışlardır. Analitik yöntem olarak

Uluslararası resmi yöntem olan AOAC 2000.03' ü (ufak modifikasyonlarla) kullanmışlardır. 2004, 2005 ve 2006 yılları arasında tespit ettikleri ortalama OTA seviyeleri sırasıyla 0.30, 0.28, 0.76 ng/g ve maksimum seviyeler sırasıyla 1.8, 1.4, 3.3 ng/kg olarak belirlenmiştir.

Zaied vd. (2009) Tunus' ta yaptıkları çalışmada; buğday, arpa, sorgum ve pirinç gibi tahıl ürünlerinde OTA araştırması yapmışlardır. HPLC/FLD kullanılarak yapılan analizlerde 110 buğday, 113 sorgum, 96 pirinç ve 103 arpa numunesi kullanılmış, OTA konsantrasyonları sırasıyla buğday ve sorgumda %38, %28 ve %40 olarak bulunmuştur.

Vega vd. (2009) Şili' de yerel pazardan temin ettikleri un, mısır nişastası ve pirinçten oluşan toplam 91 adet numunede OTA taraması yapmışlardır. Numuneler laboratuvara ulaşır ulaşmaz analize alınmış, un için ortalama değer 0.15 µg/kg, sadece 1 pirinç numunesinde 12.5 µg/kg sonuç bulunmuştur. Mısır nişastasının ortalama değeri LOQ değerinin altında kaldığı için örneklerin % 50' sinden fazlasının negatif olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, un ve mısır nişastası örneklerinin Avruğa Birliği limitinin altında olduğu (3 µg/kg) görülmüştür.

Zinedine (2010)'nin Fas'ta ticari olarak satılan 60 adet buğday, arpa ve mısır örneğini analize alıp mikotoksin kontaminasyonu üzerine bir çalışma yürütmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda mısır, buğday ve arpa örneklerinin sırasıyla % 40, %40 ve % 55'inin OTA ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Mısır örneklerinde ortalama değerin 1.08 µg/kg olup en yüksek değerin 7.22 µg/kg, buğday örneklerinde ortalama değerin 0.42 µg/kg, en yüksek değerin 1.72 µg/kg, arpa örneklerinde ortalama değerin 0.7 µg/kg, OTA seviyesi 0.04-0.8 µg/kg arasında olduğu bildirilmiştir.

Alvito vd. (2010) Portekizde bebek mamalarında bulunan aflatoksin ve OTA bulunmasıyla ilgili yaptıkları araştırmada, 27 tahıl içerikli bebek mamasının 12 tanesinde pozitif sonuçla karşılaşmışlardır. Bu 12 numunede; 2 adet AFM1, 2 adet AFM1 ve OTA, 2 adet Aflatoksin B1 (AFB1) ve OTA, 7 adet OTA tespit edilmiştir. Bu numuneler için AFM1 konsantrasyonu 0.017-0.041 µg/kg

arasında, OTA konsantrasyonu 0.034-0.21 µg/kg arasında, AFB1 ise tek numunede 0.009 µg/kg konsatrasyondadır. Olumlu sonuçların %67' sinin OTA içerdiği belirlenmiş ancak değerlendirmeler sonucunda miktar olarak bebek mamalarında bu toksinlerin varlığının bir halk sorunu oluşturmadığı belirtilmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışma Portekiz' de bebek mamalarında yapılan ilk çalışmadır.

Özden vd. (2012) 2010 yılında İstanbul' da farklı süpermarketlerden 37 kahvaltılık gevrek ve 21 tahıl bazlı bebek maması toplamışlardır. Yine 2008-2010 yılları arasında farklı süpermarketlerden, piyasadan ve geleneksel yöntemlerle üretilmiş 84 adet tarhana numunesi toplamışlardır. Yapılan analizler sonunda; 37 kahvaltılık gevrekten sekizi (%21.62) 0.06-0.42 µg/kg aralığında OTA tespit edilmiş ve ortalama değer 0.32 µg/kg' dır. 21 tahıl bazlı bebek mamasından dördü (%19.05) 0.08-0.20 µg/kg konsantrasyonlarında ve ortalama 0.14 µg/kg değerinde OTA içermektedir. 84 tarhana örneğinden kırk yedisi (%55.95), 0.12 ila 1.85 µg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda OTA içerdiği görülmüş ve ortalama değer 0.41 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Tarhana örneklerinin % 55.95' inin OTA ile kontamine olduğu görülse AB limitlerinin (3 µg/kg) ve TGK' da belirlenmiş de tahıl türevi ürünler için limitlerin altında kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışma tarhanadaki OTA kontaminasyonuyla ile ilgili ilk çalışmadır.

Tosun (2015), tez çalışmasında İstanbul' un çeşitli semtlerinden toplam 75 adet pul biber örneği analiz etmiş, 31 adet kapalı ambalajda ve 44 adet açıkta satılan markasız pul biber için OTA risk değerlendirmesi yapılmıştır. Kapalı ambalajdaki örneklerin %87.10'unda 0.055-0.982 µg/kg, markasız açıkta satılan örneklerin hepsinde 1.118-31.736 µg/kg konsantrasyon aralığında OTA' ya rastlanmıştır.

Kara vd. (2015), Çorum' da ticarileştirilen tahıl unlarında (60 adet buğday, 16 adet pirinç, 24 adet mısır) OTA ve aflatoksin birlikteliğinin belirlenmesi üzerine çalışmışlardır. Numuneler, immünoafinite kolonu (IAC) temizleme prosedüründen sonra floresan algılamalı (HPLC/FLD) yüksek performanslı sıvı

kromatografisi ile analiz edilmiştir. 2011-2013 yılları arasında alınan buğday unu ve pirinç ununda aflatoksine rastlanmamıştır. 60 adet buğday ununun %26,7' sinde ortalama 0.247 µg/kg konsantrasyonda, 16 adet pirinç unu örneğinin % 18.8' inde ortalama 0.154 µg/kg konsantrasyonda OTA tespit edilmiştir. 24 adet mısır ununun % 66.7' sinde aflatoksin, %41.7' sinde OTA , % 37.5' inde hem aflatoksin hem OTA bulunmuştur.

Majeed vd. (2018) de ticari olarak temin edilebilen mısır gevreği, mısır unu, yağda patlamış mısır, patlamış mısır, beyaz un, bisküvi, ekmekten oluşan toplam 40 örnekte OTA konsatrasyonunu incelemişlerdir. Mısır unu, mısır gevreği, buğday unu, beyaz un, ekmek ve bisküvi örnekleri için sırasıyla OTA miktarı %60, %20, %20, %60, %40 bulunmuştur. En yüksek seviye 360 ng/g olarak bisküvide tespit edilmiştir. Pozitif numunelerdeki OTA seviyesinin %75'i nin AB yönetmelikleri tarafından belirlenen maksimum seviyeyi aştığı görülmüştür.

Yu vd. (2020) üzüm posasında OTA içeriğinin farklı yöntemlerle azaltılmasıyla ilgili yaptığı çalışmada, öncelikle OTA içeren üzüm posası örneklerini 15 psi ve 121^0C' de ısıl basınç altında tutmuş ve OTA' nın önemli ölçüde azaldığını tespit etmiştir. 10, 20 ve 30 dakikalık sürelerde en fazla azalma 20. dakikada gerçekleşmiş, azalma oranları sırasıyla %19.21-67.87, %37.64-79.88 ve %43.77-78.01 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın devamında yine OTA içeren üzüm posasıyla tahıl ürünü olan unu karıştırıp kurabiye elde etmiş, hamurla pişirme sonrası OTA' da meydana gelen değişimi incelemiştir. Literatürdeki diğer çalışmaların tersine, kurabiyedeki OTA içeriğinin hamurdaki OTA' dan %45.4- 69.8 fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, Vidal vd. (2014a)' nin sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Vidal vd. (2014a)' nin çalışmasında hamurdan ekmeğe geçişte OTA' da % 40'lık bir artış meydana gelmiştir. Yine Vidal vd. (2014b), başka bir çalışmada, ekmek yapımında ekşi maya kullanımıyla OTA' nın değişimini araştırmış, hamurun fermentasyonu sırasında OTA konsantrasyonunda hafif bir azalma (%29) tespit etmiş fakat toplam OTA içeriğinde önemli bir değişiklik gözlemleyememiştir. Ayrıca, ekşi maya ilavesinin bir sonucu olarak önemli bir etkisi bulunmamıştır.

2.4. Ekmek Üzerine Yapılan OTA Çalışmaları

Osborne (1980), 50 adet küflü ekmek numunesinde TLC ile OTA taraması yapmıştır. OTA varlığını HPLC ile doğrulamıştır. OTA yalnızca bir ekmek numunesinde 0.21 µg/kg konsantrasyonda tespit edilmiştir.

Scudamore vd. (2003), laboratuvar koşullarında *P. verrucosum* ile tam buğday partilerini kontamine etmiş, daha sonra bu buğdaylardan kepekli un ve beyaz un üretmiştir. Akabinde her iki un ekmek prosesine girmiş; kepekli un OTA konsatrasyonunun maksimum % 40' ını kaybederken, beyaz unda bu oran kepek ve dış fraksiyonların temizlenerek yıkanması ve uzaklaştırılmasıyla %75 olarak belirlenmiştir.

Cengiz vd. (2007), Bursa ilinde, Türk Silahlı Kuvvetlerinin farklı birimlerinden ve ayrı fırın market gibi yerlerden alınan, 132 adet farklı ekmek ve undaki OTA varlığını araştırmışlardır. Bu örnekler içerisinde; 34 adet beyaz un, 10 adet mısır unu, 14 adet kepekli un ve 36 adet beyaz ekmek, 10 adet mısır ekmeği, 28 adet kepekli ekmek bulunmaktadır. Örneklerdeki OTA seviyeleri ELISA tekniği ile tespit edilmiş olup konsantrasyonları beyaz un için 6.89±0.46 µg/kg, kepekli un için 9.30±1.33 µg/kg, mısır unu için 6.39±1.10 µg/kg, beyaz ekmekler için 4.87±0.61 µg/kg, kepekli ekmek için 7.84±0.39 µg/kg ve mısır ekmeği için 4.94±0.46 µg/kg' dır. Çalışmalar sonucunda 132 numunenin 96' sında OTA tespit edilmiş, konsatrasyonun Avrupa Komisyonu' nun belirlediği ve TGK maksimun limit değeri olan 3 ng/g' ın üzerinde bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, tüketime sunulan un ve ekmeklerin insan sağlığını tehdit edecek düzeyde olduğunu göstermektedir.

Zinedine vd. (2007)' de Fas' taki fırınlardan rastgele toplamış oldukları 100 adet buğday ekmeği örneğinde OTA varlığını incelemişlerdir. Buğday ekmeği örneklerinin 48' inde 0.14-149.0 µg/kg konsantrasyonda OTA tespit edildiği bildirilmiştir. OTA bulundurulan ekmeklerin içerisinde 26 ekmeğin OTA konsantrasyonunun (13±1.5 ng/g), Avrupa Komisyonu tarafından belirlenen 3 ng/g' dan yüksek olduğu belirlenmiştir. Fas'ta gıdalarda izin verilen maksimum

mikotoksin seviyeleri için herhangi bir hükümet düzelmesi yoktur. Ancak toksin düzenlemeleri için bir proje yürütülmektedir. Bu projede tahıl ve türevlerinde OTA için izin verilen değer 30 ng/g olarak belirlenmiştir. Araştırmacıların bu çalışmasıyla Fas' taki ekmek örneklerinde OTA konsantrasyonunun diğer ülkelere oranla yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Juan vd. (2008b) Portekizde yaptıkları bir çalışmada 31 buğday ekmeği ve 30 mısır ekmeğinden oluşan 61 numuneyi 7 aylık bir sürede fırınlardan, şekerleme dükkanlarından ve süpermarketlerden temin etmişlerdir. Çalışmalar sonucunda OTA konsantrasyonının ortalama 0.23 ng/g olduğu tespit edilmiştir. Analiz edilen 21 mısır ekmeğinde (%70) OTA tespit edilmiş, en yüksek konsantrasyon 0.44 ng/kg bulunmuştur. Buğday ekmeği için 4 örnekte (%12.9) OTA tespit edilmiş, ortalama konsantrasyon 0,02 ng/g bulunmuştur. Sonuçta toplam numunenin %40.9' unda (25 numune) OTA, 0,033±0,86 ng/g arasında değişen seviyelerde tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda mısır ekmeklerinin daha fazla OTA ile kontamine olduğu belirlenmiş, ancak bu örneklerde tolere edilebilir haftalık değerin üzerine çıkmadığı bu nedenle potansiyel bir tehlike oluşturmadığı görüşü bildirilmiştir.

Bento vd. (2009) Portekiz' in Algarve ve Bragança bölgelerinden temin ettikleri 30 adet buğday ekmeğinde OTA araması yapmışlardır. Analize alınan ekmeklerin OTA içeriği, Algarve'de maksimum 0.49 ng/g ve Bragança'da 0.43 ng/g bulunmuş, bu miktarların Avrupa mevzuatı tarafından belirlenen 3 ng/g maksimum sınırın altında olduğu belirlenmiştir. FAO/WHO'nun günde 250 g ekmek tüketimi önerdiği düşünülürse Algarve bölgesinde yaşayanların OTA alımının günlük yaklaşık 0.26 ng/kg vücut ağırlığı/gün, Bragança'da yaşayanların 0.38 ng/kg vücut ağırlığı/gün OTA konsantrasyonuna maruz kaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, Portekiz' in bu iki bölgesinde OTA kontaminasyonun kontrol altında olduğu ve tüketici sağlığına yönelik bir tehtit oluşturma olasılığının düşük olduğu görülmüştür.

Valle-Algarra vd. (2009), yaptıkları çalışmada; 2 µg/kg, 5 µg/kg ve 10 µg/kg konsantrasyonlardaki OTA'nın unla kontamine edilmesi sonucu, 29-30^{0}C hamur

fermentasyonunun ve 190^{0}C /50 dakika, 207^{0}C / 40 dakika, 223^{0}C /35 dakika, 240^{0}C /30 dakika derece ve dakikalarda pişirme işleminin OTA üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Fermentasyon işlemi sonrasında OTA düzeyindeki değişim %29.8-33.5 oranında azalma şeklinde gerçekleşmiştir. Pişirme sonucunda ise OTA düzeyindeki değişim ortalama %32.9 azalma olarak belirlenmiştir.

Duarte vd. (2010b), yaptıkları çalışmada 2007 yılında Portekiz' in Porto ve Coimbra şehirlerinden, taze ve paketlenmiş şekilde toplanan ekmeklerde OTA taraması yapmışlardır. Analizlerde OTA konsantrasyonlarını belirlemek için LC/FD (floresans dedektörlü sıvı kromatografisi) kullanılmıştır. Coimbra şehrinden 75 adet (30 buğday taze ekmek, 30 buğday paketlenmiş ekmek ve 15 mısır ekmeği), Porto'dan 93 (47 buğday taze ekmek ve 23'ü Avintes mısır ekmeği olmak üzere 46 mısır ekmeği) toplamda 168 adet ekmek temin edilmiştir. Sonuçlar, numunelerin %84'ünün, maksimum 3.85 ng/g (AB maksimum limitinin üzerinde, 3 ng/g) ile kontamine olduğunu göstermiştir. Taze buğday ekmeğinin ortalama OTA seviyesi (Coimbra; 0.34 ng/g ve Porto 0.19 ng/g), paketli buğday ekmeğine göre (Coimbra; 0.21 ng/g) daha yüksek düzeylerde bulunmuştur. Ayrıca mısır ekmeğinde, yani Avintes mısır ekmeğinde daha yüksek bir ortalama kontaminasyon seviyesi (3.85 ng/g) gözlenmiş bu değer Avrupa Komisyonu' nun işlenmiş tahıl ürünleri maksimum limitinin (3ng/g) üzerinde bulunmuştur.

Peng vd. (2015), Çin buğulanmış ekmeği üretim prosesinde ki OTA akıbetini belirlemek için yaptıkları çalışmada, hamur, fermente hamur ve ekmekteki OTA konsantrasyonunu araştırmışlardır. Hamur yoğurulduktan sonra 38^{0}C' de 40 dakika kitle fermentasyonuna bırakılmış, elle şekil verildikten sonra tekrar 15 dakika parça fermentasyonuna bırakılmıştır. Fermente hamur, bir buğulanma odasında 100^{0}C' de 40 dakika pişirilmiş, sonra oda sıcaklığında soğutulduktan sonra analiz alınmışlardır. Yoğurulmuş, fermente edilmiş hamurdaki ve buğulanarak pişirilmiş ekmekteki OTA seviyeleri benzer bulunmuş olsa da, una kıyasla %11-16 aralığında arttığı tespit edilmiştir. Bu artışın enzimatik dönüşümle veya OTA' nın enzimatik hidrolizine bağlı olduğu düşünülmüştür.

Gölge ve Kabak (2016), Adana ve Mersin illerinden, farklı fırın, bakkal ve marketlerden temin ettikleri 102 adet buğday ekmeği numunesinde OTA varlığını HPLC/FLD ile birleştirilmiş yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi kullanarak analiz etmiştir. Analize alınan örneklerin 10 tanesinde yani % 9.8' inde, ortalama 1.58 µg/kg konsantrasyonda OTA tespit edilmiştir. OTA ile kontamine olmuş örneklerin hiçbiri TGK ve Avrupa Komisyonu' nun işlenmiş tahıl ürünlerinde bulunması gereken maksimum limiti (3 µg/kg) geçmemiştir. Ekmek tüketimiyle tahmini günlük OTA alımları, Türk tüketiciler için 0.85 ng/kg vücut ağırlığı/gün olarak hesaplanmştır. Bu araştırma Türkiye' de buğday ekmeği tüketimi yoluyla OTA' ya maruz kalınmasına ilişkin hazırlanan ilk rapor olma özelliğindedir.

Koç (2016), Adana' da fırın, market ve temin ettiği 4 pide ve 46 somun ekmeğinde OTA varlığını HPLC/FD cihazıyla incelemiştir. Çalışma sonucunda 4 somun ekmeğinde ve 1 pide ekmeğinde OTA tespit edilmiştir. Ekmeklerdeki OTA konsantrasyonları Avrupa Komisyonu ve TGK tarafından belirlenen 3 µg/kg yasal limitin altında bulunmuştur.

Savaş (2016), ekmek yapımı süresince OTA' nın yıkımını incelediği araştırmada; OTA standardı ile 5 ve 10 µg/kg konsantrasyonda kirletilmiş un kullanarak; hamur yoğurma, fermentasyon ve ekmeğin pişirilmesi aşamalarından sonra OTA seviyesini incelemiştir. OTA konsantrasyonunda ki azalma oranı en belirgin fermentasyon ve pişirme aşamalarında gerçekleşmiş, pişirmenin OTA yıkımına etkisi daha fazla bulunmuştur.

Milani ve Heidari (2017) OTA' nın ekmek yapımı sırasındaki stabilitesini incelediği araştırmada, mikotoksin katkılı un, üç çeşit maya (*S. cerevisiae* bazlı) ve *L. casei, L. rhamnosus, L.acidophilus* ve *L. fermentum* içeren ekşi hamur ile hazırlanmıştır. Una; tuz, maya/ekşi maya hamur ve su karıştırılarak hamur yoğurulmuş ve ilk fermentasyon (kitle fermentasyonu) 30^0C' de 90 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Sonra hamur eşit parçalara ayrılmış 30^0C' de 10 dakika daha fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon sonunda 200^0C' de 20 dakika fırınlanmıştır. 30°C' de 90 dakika boyunca sıkıştırılmış maya, hazır kuru

maya, aktif kuru maya ve ekşi hamurla ilk fermentasyon sonra OTA' nın azalma yüzdesi sırayla %45.83, %16.66, %8.69 ve %9.09 bulunmuş; en fazla yıkım sıkıştırılmış maya kullanılan unda gerçekleşmiştir. Parça fermentasyonu sonucunda yapılan analiz sonucunda OTA' nın azalma yüzdesi aynı sırayla %30.76, %10.0, % 9.52 ve %5.0 bulunmuş; birinci fermentasyona paralel sonuçlar elde edilmiştir. 200^0C' de 20 dakika fırınlanma sonrası yıkım %55.55, %22.22, %10.52 ve %5.26 olarak belirlenmiştir. Sonuçta, sıkıştırılmış maya suşunun OTA stabilitesi üzerinde en etkili maya olduğu, diğer mayaların önemli ölçüde etkili olmadığı tespit edilmiştir.

Khaneghah vd. (2018), mikotoksinlerle ilgili 1983 ve Haziran 2017 yılları arasında yayınlanan 9496 makale arasından; potansiyel uygunluklarına bakılarak ve ayrıntılı değerlendirmelerden geçirdikten sonra 28' ini seçmiş, toplamda 543 veriyi meta analize tabi tutmuştur. Makalelerde incelenen ürünler un, hamur, ekmek, makarna, bisküvi gibi tahıl bazlı ürünler olup mikotoksinlerin bu ürünlere uygulanan işlemlerle uğradıkları değişimler dikkate alınmıştır. İncelemeler sonucunda, unun öğütülmesi sırasında %9, hamur fermentasyonu sırasında %33, ekmeğin pişirilmesi esnasında % 2 OTA seviyesinde düşüş görülmüştür.

Mozaffary vd. (2019) ekmek yapımı sırasında maya miktarının ve fermentasyon sıcaklığı gibi farklı değişkenlerin OTA üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla una OTA ilave etmişler ve sonra bu unu ekmek üretim prosesine dahil etmişlerdir. Un, hamur ve ekmekteki OTA seviyelerini, HPLC/FLD ile ölçmüşlerdir. Maya (*S.cerevisiae*) miktarının artmasıyla %1' den %2' ye ve fermantasyon sıcaklığının 25^0C' den 30^0C'ye yükseltilmesi, OTA azalmasının %31.17' den %59.41' e yükselmesine sebep olmuştur. Pişirme esnasındaki OTA kaybı ise %19.21 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak maya miktarının ve fermentasyon sıcaklığının artırılması, buğday ekmeğindeki OTA miktarını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Bryła vd. (2021)'nin çalışmasında OTA 'nın çavdar ekmeği üretim prosesleri ve pizza buğday temelli üretim prosesleri (hamur yoğurma, hamur fermantasyonu

ve fırınlama dahil) sırasındaki stabilitesi araştırılmıştır. Ekmek, doğal olarak kontamine olmuş çavdar unuyla hazırlanmış OTA konsantrasyonu 6.41±0.52 µg/kg) ve 180^0C'de 40 dakika ve 240^0C'de 70 dakika pişirilmiştir. Pizza tabanları ise yapay olarak OTA ile kirletilmiş buğday unundan hazırlanmış (OTA konsantrason 8 µg/kg ve 18 µg/kg) ve 320^0C'de 8 dakika ve 370^0C'de 6 dakika fırınlanmıştır. Hamur pişirildikten sonra OTA konsantrasyonları 180^0C'de pişirilen ekmek için %25.6, 240^0C'de pişirilen ekmek için %23 ve pizza bazları için %8.0–%25.4 oranında azalmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında kullanılan materyalin özellikleri aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

Buğday unu: Hediye Un Sanayi A.Ş (Isparta)'den temin edilen Katkısız Ekmeklik Buğday Unu kullanılmıştır. Yeni öğütülmüş undan alınan un numunesi aynı gün içerisinde Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Tahıl İşleme Teknolojisi Laboratuvarına getirilmiş ve olgunlaştırma amacıyla yaklaşık 25^0C'de 3 hafta süreyle bekletilmiştir.

Tuz: Piyasadan temin edilen TS 933 (TSE 2003) Yemeklik Tuz Standardına uygun özelliklerdeki rafine kristal tuz kullanılmıştır.

Su: Süleyman Demirel Üniversitesi kampüsü içme suyu kullanılmıştır.

Ultra saf su: Milli-Q sistemde saflaştırılmış ve mobil faz, ekstraksiyon solventi, enjeksiyon solventi ve analizin diğer yıkama aşamalarında kullanılmıştır.

OTA Standardı: Sigma- Aldrich marka, okratoksin A standart çözeltisi 10 µg/ml sıvı formda temin edilmiş olup, analiz için kullanılıncaya kadar buzdolabı koşullarında -18^0C saklanmıştır.

Analizlerde kullanılan methanol ve glasiyel asetik asit (Merck, Darmstadt, Germany), Asetonitril (Honevwell, Seelze, Germany), Phosphate buffered saline (PBS, Sigma, USA) firmalarından analitik saflıkta olacak şekilde temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. OTA ara stok çözeltisi hazırlama

Un numunesini kontamine etmek ve HPLC' de kalibrasyonda kullanılmak üzere 10 µg/ml (ppm) konsantrasyonda, OTA ana stok standart çözeltisinden ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ara stok çözeltiler buzdolabı koşullarında $+4^0$C' de tutulmuş, kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır.

3.2.2. Una OTA eklenmesi

Bazlama üretim prosesinde kullanılan katkısız buğday ununun tespit limitinin üzerinde OTA bulundurmadığı belirlenmiştir. Bu undan 500 g alınarak 5 µg/kg ve 10 µg/kg konsantasyonlarda OTA ara stok çözeltiyle kontaminasyonu sağlanmış, karanlık bir yerde ara ara karıştırarak 1 saat beklemeye alınmıştır.

3.2.3. Ekşi maya üretimi

Şekil 3.1' de gösterilen ekşi maya örneklerinin hazırlanması Özuğur (2011) tarafından verilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak aşağıda verilen yol izlenerek gerçekleşmiştir.



Şekil 3.1. Ekşi maya üretimi

1. Gün: 100 g un, 150 ml içme suyu ve 3 g nohut cam bir kasenin içerisinde tahta kaşıkla karıştırılmış ve daha sonra üstü temiz bir bezle örtülerek 2 gün süreyle inkübatörde (Nüve, Türkiye) 30^0C'de fermentasyona bırakılmıştır.

3. Gün: Yukarıdaki şartlarda bekletilen hamurun üzerine 100 g un, 100 ml içme suyu eklenerek tekrar karıştırılmış ve üstü örtülerek 1 gün süreyle 30^0C'de bekletilmiştir.

4. Gün: Aynı hamurun üzerine tekrar 100 g un ve 100 ml içme suyu eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra üstü örtülerek 1 gün 30^0C'de bekletilmiştir.

5. Gün: Hazırlanan ekşi hamurların pH metre (pHmeter, Çin) ile sürekli olarak pH değerleri ölçülmüş ve 5. günde pH değerlerinin 3.8-4.0'e düştüğü tespit edilmiştir. Bu pH değerleri ile ekşi hamurlar kullanıma hazır hale gelmiştir. Hazırlanan ekşi hamur örneklerinden yaklaşık 600 g ayrılarak diğer kullanımlar için $+4^0$C'de saklanmış ve 3 günde bir 100 g un ve 100 ml içme suyu ile besleme yapılarak bekletilmiştir.

3.2.4. Bazlama ekmeği üretiminde ön denemeler

Bazlama ekmeği üretimi sırasında kullanılacak uygun yöntem ve oranların belirlenebilmesi için farklı koşullarda ön denemeler yapılmıştır. Bu ön denemeler; bazlama ekmeği formülasyonu, yoğurma şekli, fermentasyon süreleri, fermentasyon şartları, bazlamanın ağırlığı, çapı, yükseklik oranı, kaç derecede pişirileceği, depolama sürecinde saklama koşulları olmak üzere çeşitli koşullardan oluşmaktadır.

3.2.4.1. Bazlama formülasyonunun belirlenmesi

Bazlama yapımı için; 500 g un, %1.5 tuz (TS 933, TSE 2003 Yemeklik Tuz standardına uygun), %3 ekşi maya, %60 (deneme1) ve %65 (deneme2) su kullanılmıştır. Bazlama örnekleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Tahıl İşleme Teknolojisi Laboratuvarında

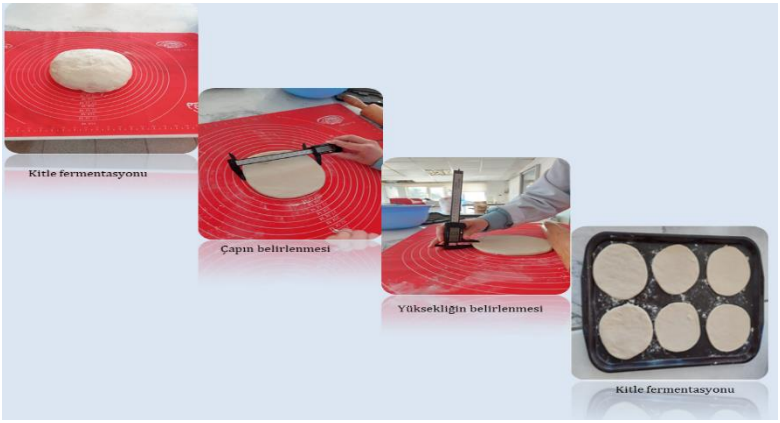
üretilmiştir. Yoğurma işlemi için laboratuvarda bulunan spiral hamur yoğurma makinesi (Günsa, İzmir) kullanılmış, yoğurucu içerisine suyun bir kısmı ile maya konulup çözünmesi sağlanmıştır. Üzerine un eklenerek 5 dakika yavaş devirde, sonra kalan su ile tuz çözdürülerek 5 dakika hızlı devirde yoğurulmuştur (Şekil 3.2). Yoğurma sonrası en iyi hamur stabilitesi ve yumuşaklığı %65 su ilave edilerek üretilen bazlama örneklerinde tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda asıl bazlama örneklerinin üretiminde kullanılacak formülasyon 500 g un, %1.5 tuz, %3 ekşi maya, %65 su olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Hamurun yoğurulması

3.4.2.2. Bazlama ağırlığının, çapının, kalınlığının ve fermentasyon sürelerinin belirlenmesi

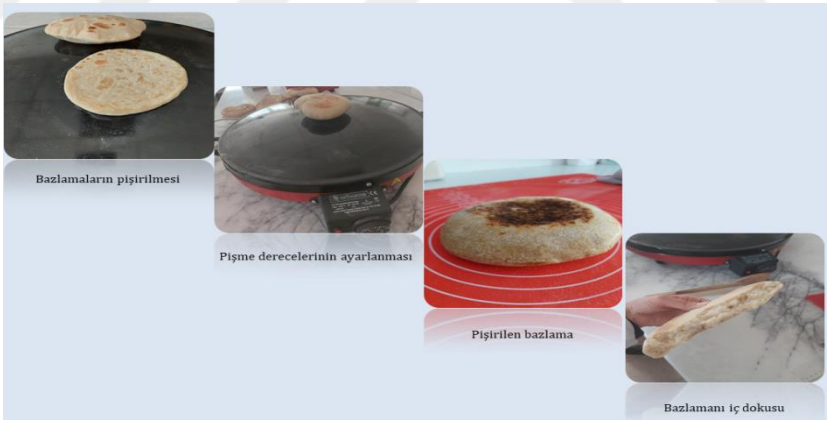
Yoğurulan hamur 5 dakika kitle fermentasyonuna bırakılmıştır. Daha sonra 150, 175, 200 gramlık eşit parçalara bölünerek 140, 150 mm çapında 5, 6 ve 7 mm kalınlıkta, yuvarlak şekil verilmiştir. Daha sonra bu hamurlar 25±5^{0}C'de oda sıcaklığında 1.5, 3, 6 ve 12 saat üzerleri nemli bez örtülerek fermentasyona bırakılmıştır (Şekil 3.3). Yapılan denemeler sonrası bir bazlama üretiminde kullanılacak hamur ağırlığı 150 gr, hamur çapı 140 mm, hamur kalınlığı 7 mm, fermentasyon süreleri ise 1.5 saat ve 3 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Ön denemeler ile bazlama hamurlarının ağırlık, çap, kalınlık ve fermentasyon süresinin belirlenmesi

3.4.2.3. Pişirme derecesi ve süresinin belirlenmesi

Fermentasyon sonrası 200, 250 ve 300^{0}C'de (10 dakika (3 dakika ön yüz, 3 dakika arka yüz, 2 dakika tekrar ön yüz, 2 dakika tekrar arka yüz olacak şekilde) elektrikli sac (Orhome, Türkiye) üzerinde pişirilmiştir (Şekil 3.4).



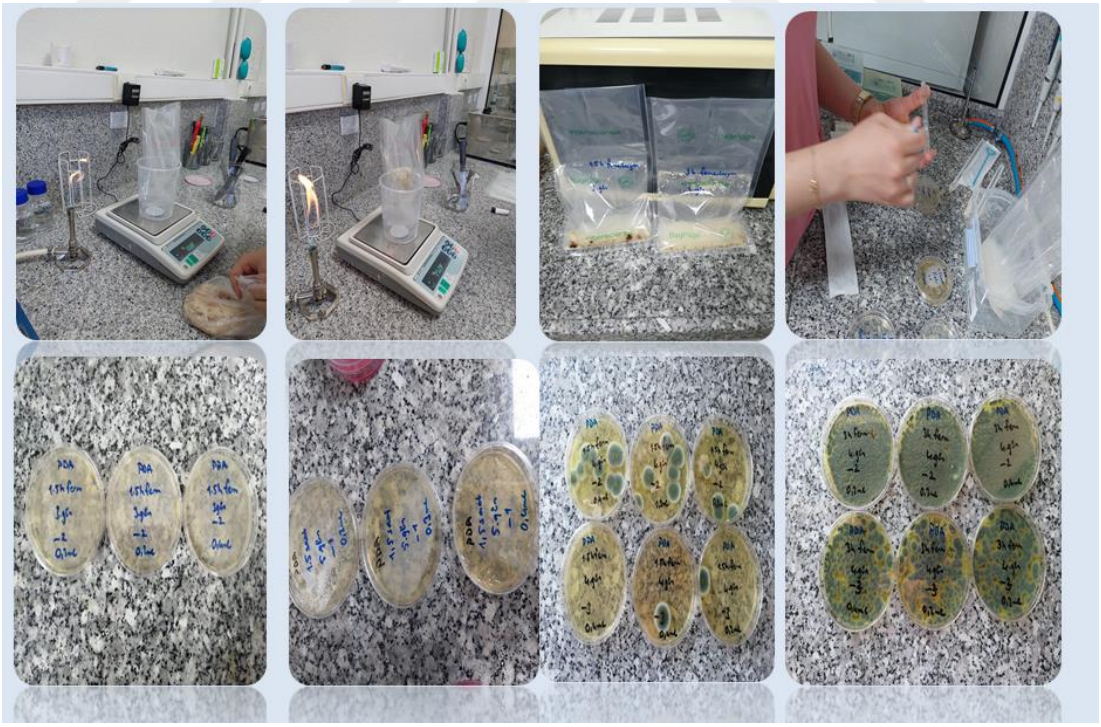
Şekil 3.4. Pişirme derecesi ve süresinin belirlenmesi

Yapılan denemeler sonrası pişirme süresi 300^{0}C'de 10 dakika olarak belirlenmiştir.

3.4.2.4. Depolama süresinin belirlenmesi

Pişirilen bazlamalar oda sıcaklığında soğutulduktan sonra çift katli polietilen ambalajlara konularak, 25±2 ^{0}C'de 0,3, 5, 7 ve 10 gün depolanmıştır. Bazlama

örnekleri üzerinde maya ve küf analizi yapılmıştır. Bunun için hijyenik şartlarda örnek kaplarına 25 g örnek tartılmış, örnekler 225 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) ile homojen hale getirilip seyreltilerek uygun dilüsyon oranları hazırlanmıştır (Şekil 3.5). Dilüsyonlardan alınan 0.1 ml örnekle patates dekstroz agar (PDA) besiyerinde yayma yöntemi uygulanarak besiyeri üzerinde ekim gerçekleştirilmiştir. 25^0C' de 3-5 gün inkübasyona (Pol-Eko-Apatura, Polonya) bırakılan petrilerde maya küf sayımı yapılmış sonuçlar 1 gramda bulunan koloni birimi (kob/g) olarak değerlendirilmiştir. 0, 1 ve 2. günde 25±2 ^{0}C'de herhangi bir maya küf üremesi gözlenmemiş, 3. gün 1.5 saat fermentasyona bırakılan bazlama $7.6*10^2$, 3 saat fermentasyona bırakılan bazlama $2.8*10^2$ kob/g, 4. gün 1.5 saat fermentasyona bırakılan bazlama $3.2*10^3$, 3 saat fermentasyona bırakılan bazlama $5.4*10^2$ kob/g, 5. gün 1.5 saat fermentasyona bırakılan bazlama $7.4*10^4$, 3 saat fermentasyona bırakılan bazlama $3.5*10^3$ kob/g olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.5). Elde edilen sonuçlar TS ISO 21527-2' ye göre değerlendirilmiş, depolama süresi 25±2 ^{0}C'de 0, 5 ve 10 gün olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Depolama süresinin için maya küf analizinin yapılması

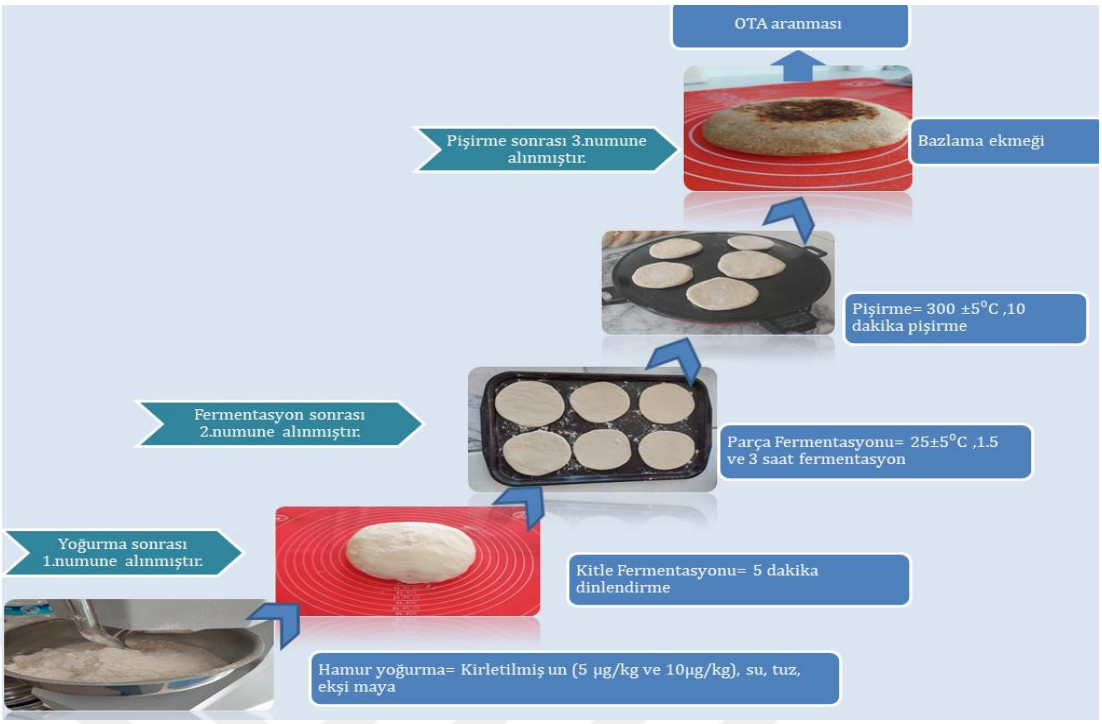
3.2.5. Bazlama üretimi

Bazlama üretimi için Çizelge 3.1 ‘ de formülasyonda belirtilen miktarlarda 500 g un (5 µg/kg ve 10 µg/kg olacak şekilde OTA ile kirletilmiş), %1.5 tuz (TS 933, TSE 2003 Yemeklik Tuz standardına uygun), %3 ekşi maya, %65 su kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Bazlama formülasyonu

Bileşim	**Miktar**
Un	500 g
Tuz	7.5 g
Ekşi Maya	15 g
Su	325 ml

Bazlama örnekleri Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Tahıl İşleme Teknolojisi Laboratuvarı’ nda üretilmiştir. Bazlama yapım aşamaları ve numune alma planı Şekil 3.6’ da gösterilmiştir. Yoğurma işlemi için laboratuvarda bulunan spiral hamur yoğurma makinesi (Günsa, İzmir) kullanılmış, yoğurucu içerisine suyun bir kısmı ile maya konulup çözünmesi sağlanmıştır. Üzerine un eklenerek 5 dakika yavaş devirde, sonra kalan su ile tuz çözdürülerek 5 dakika hızlı devirde yoğurulmuştur. Ardından 5 dakika kitle fermentasyonuna bırakılmıştır. Daha sonra 150 gramlık eşit parçalara bölünerek 140 mm çapında, 7 mm kalınlıkta, yuvarlak şekil verilen hamurlar 25 ± 5^{0}C’de 1.5 saat ve 3 saat üzerleri nemli bez örtülerek fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon sonrası 300 ± 5^{0}C’de 10 dakika (3 dakika ön yüz, 3 dakika arka yüz, 2 dakika tekrar ön yüz, 2 dakika tekrar arka yüz olacak şekilde) elektrikli sac (Orhome, Türkiye) üzerinde pişirilmiştir. Pişirilen bazlamalar oda sıcaklığında soğutulduktan sonra çift katli polietilen ambalajlara konularak, Isparta Gıda Kontrol Laboratuvarı Mikotoksin ve Kalıntı Biriminde 25 ± 2^{0}C’de 0, 5 ve 10 gün depolanmış ve depolanan bazlamalar OTA analizine alınmıştır.



Şekil 3.6. Bazlama yapım aşamaları ve numune alma planı

Bazlama yapımı boyunca; hamur yoğurma işleminin, 25±5^{0}C'de 1.5 ve 3 saat fermentasyon sürelerinin, 300±5^{0}C'de 10 dakika süre ile pişirme işleminin ve 25±2^{0}C'de 0, 5 ve 10 gün depolamanın OTA üzerindeki değişim miktarları incelenmiştir. Hamur ve bazlamalara yapılan analizlerde 5 µg/kg ve 10 µg/kg düzeylerindeki OTA miktarlarının azalma oranları karşılaştırılmıştır. Çalışmalar 2 paralelli üç tekerrürlü gerçekleştirilmiş olup toplamda 108 numune çalışılmıştır.

3.2.6. Bazlama örneklerinde OTA varlığının tespiti

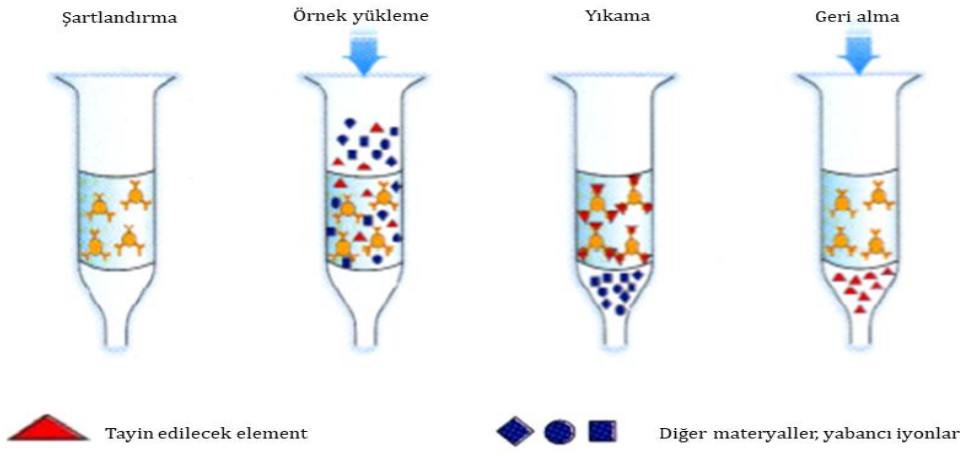
Bu çalışmada un, hamur ve bazlama örneklerindeki OTA' nın tespiti için yapılan literatür taramaları sonucunda (Entwisle vd., 2000; Chung ve Kwong, 2007; Juan 2007; Juan, 2008b; Ng vd., 2009; Savaş, 2016) bazı modifikasyonlarla AOAC. Method 2000.03 (AOAC, 2000) metodu uygulanmıştır.

3.2.6.1. Örnek hazırlama

100 ml'lik behere 25 g un, hamur ve bazlama örnekleri hassas terazi (And GR 200, Japonya) ile tartılmış, üzerine 100 ml asetonitril/su (60/40) karışımı eklenerek blender (Waring Commercial Laboratory Blender, Stamford CT, USA)' a aktarılmış ve yüksek hızda (22000 rpm) 2 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra Whatman 113 (Cytiva, Çin) filtre kağıdından süzülmüştür. Süzme işlemi sonrası elde edilen filtrattan 4 ml süzüntü, 44 ml PBS (Sigma, USA) ile 50 ml' lik santrifüj tüpüne konulup ağzı kapatılarak 5 saniye boyunca çalkalanmıştır.

3.2.6.2. İmmüno affinite kolondan geçirme

OTA immüno affinite kolon olarak Aokin marka, OTA' ya karşı spesifik antikorları içeren ImmunoClean C OTA kolon (Berlin, Germany) kullanılmıştır. Temin edilen immüno affinite kolon $+4^0$C ' de muhafaza edilmiş, analiz sırasında kullanılmadan önce oda şartlarında 18-22^0C' ye ulaşması beklenmiştir. Immüno affinite kolon kullanım prosedüründe belirlenen talimatlara göre kullanılmıştır (Aokin, 2022). Immüno affinite kolondan geçirme işlemi Şekil 3.7' de gösterilmiştir (Anonim, 2022b).



Şekil 3.7. Immüno affinite kolondan geçirme işlemi (Anonim, 2022b)

Immüno Affinite Kolon, bir pompa standına yerleştirilmiş ve üst kapağına 50 ml' lik şırınga takılarak, PBS tamponu ile seyreltilmiş ekstrakt bir ImmunoClean C OTA kolonuna aktarılmıştır ve 3 ml/dakika hızla kolondan geçirilmiştir. Bu işlem sırasında OTA, kolon içerisindeki OTA için spesifik olarak bulunan antikorlara bağlanır. Ekstraktın tamamı Immüno Affinite Kolonu'ndan geçirildikten sonra numuneden gelen safsızlıkların giderilmesi için 10 ml ultra saf su saniyede 1-2 damla akacak şekilde yıkanmıştır. Şırınga yardımıyla kolondan iki defa boş hava geçirilerek kolon kurutulmuştur. Immüno Affinite Kolon düzeneğinin altına 4 ml' lik amber vial yerleştirilip ve 1 ml methanol geçirilmiştir. Kolondan methanol akışını duracak kadar yavaşlatarak 3 dakika inkübe edilmiş sonra 1 damla/saniye olacak şekilde 3 ml methanol (3 kez 1 ml) geçirilmiştir. Methanol kolondan geçirildiğinde spesifik antikorlar denatüre olarak okratoksini salarlar. Böylelikle çözünen OTA viale alınmış olur. Elouat, azot gazı altında 40^0C tam kuruluğa gelene kadar buharlaştırılmıştır. Elde edilen tortu, HPLC (Shimadzu, Japonya) cihazında okunmak üzere 1 ml mobil fazla çözündürülüp, 1 dakika boyunca vorteks (Nüve, Türkiye) ile karıştırılmıştır. Karıştırma sonrası viale alınan elouat, floresans dedektörlü HPLC cihazına 100µl miktarda enjekte edilmiştir.

3.2.6.3. HPLC ile OTA tayini

Ekstraksiyonu yapılan un, hamur ve bazlama örneklerinden elde edilen ekstrakların HPLC cihazında okutulması, Isparta Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Mikotoksin ve Kalıntı Laboratuvarında bulunan Shimadzu (Japonya) marka HPLC cihazında yapılmıştır. Cihazda RF- 10AXL sıvı floresan dedektör, DGU- 20A3 degaser, LC-20AD LC pompa, SIL- 20A HT oto sampler, CTO- 10 AS VP kolon fırını bulunmaktadır. HPLC cihazı Şekil 3.8' de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. HPLC cihazı

HPLC cihazının çalışma şartları şu şekildedir.
Akış hızı: 0,9 ml/dk, Enjeksiyon hacmi: 100 µl, Kolon sıcaklığı: 45^0C, Dalga boyu: FLD EX: 333 (Excititaion- Uyarıcı dalga boyu), EM: 477 nm (Emission- Yayılan dalga boyu), Kolon: 250 * 4.6 mm, 5 µ, C18 (ACE ACE-121-2546 veya muadili), Mobil faz: Asetonitril- Su- Asetik Asit (48/51/1, v/v/v), Analiz süresi: 15 dakika, Basınç: minimum 0 bar, maksimum 200 bar.

Mobil faz: HPLC için kullanılacak olan mobil faz asetonitril/su/asetik asit (48/51/1 oranlarında) kullanılarak hazırlanmış, gaz kabarcığı oluşup cihazın şartlarında değişiklik yapmaması için ultrasonik su banyosu (WiseClean, Germany)' nda 30 dakika boyunca tutulmuştur.

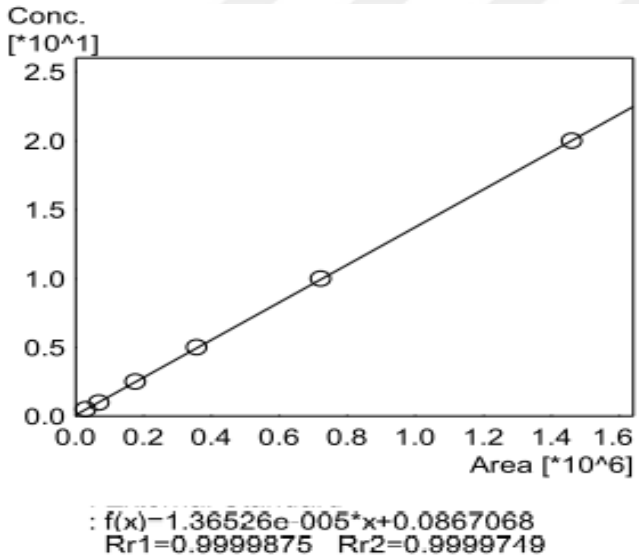
3.3. İstatistiksel değerlendirme

Verilerin normal dağılım içeresinde yer alıp almadığının belirlenmesinde "*Shapiro-Wilk normality test*" kullanılmıştır. Normal dağılım göstermiş olan verilerin istatistiksel değerlendirmesinde bağımsız örneklem *t-testi* ve *ANOVA* (tek ve çift yönlü) testi, deneme grupları arasındaki farklılığın belirlenmesinde de $TUKEY^{HSD}$ testi kullanılmıştır. Tüm istatistiksel değerlendirmeler 0,05 önem düzeyinde Rstudio (v2022.07.1) bilgisayar programında yürütülmüştür (RStudio Team; 2022).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. HPLC' nin Kalibrasyonu

Kalibrasyonda 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 ve 20.0 µg/kg' lık 6 farklı konsantrasyonda OTA kullanılmıştır. HPLC cihazına enjekte edilen bu konsantrasyonlara karşılık gelen pik alanları, cihaz içinde bulunan Shimadzu LCsolution Calibration Curve yazılımıyla 6 farklı noktada kalibrasyon eğrisi oluşturmuştur. Korelasyon Katsayısı (r^2) değeri 0.9999719 olarak bulunmuştur. Şekil. 4.1' de kalibrasyon eğrisi ve denklemi gösterilmiştir.



Şekil 4.1. OTA için kalibrasyon eğrisi

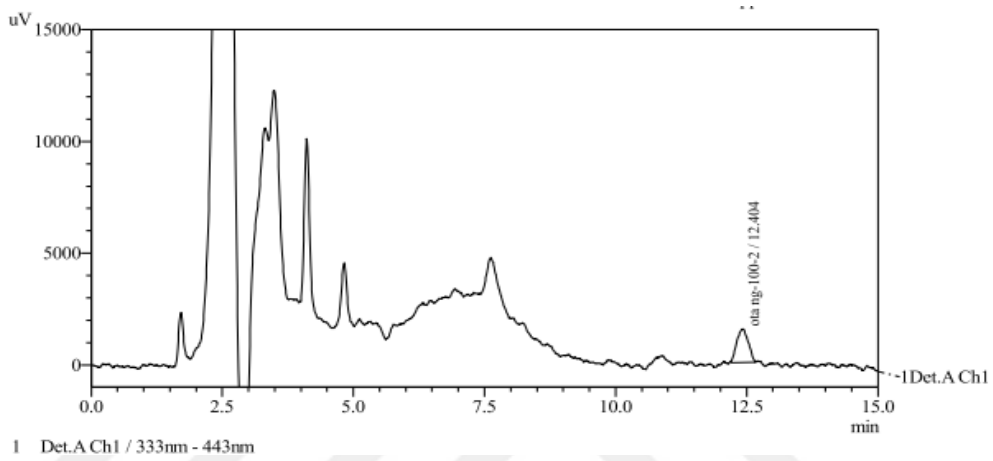
Un, hamur, farklı sürelerde fermente edilen hamur ve bazlama örneklerindeki OTA analizi yapılırken bu kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır.

4.2. Tayin Limiti (LOD), Tespit Limiti (LOQ) ve Geri Kazanım Çalışması

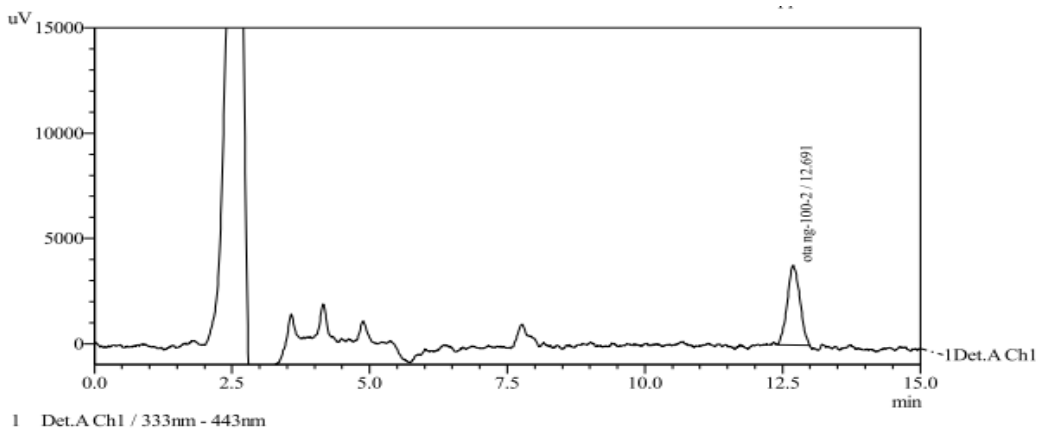
Tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ)' nin hesaplanmasında sinyal/gürültü oranı kullanılmış, LOD sinyal/gürültü oranının 3 katı, LOQ sinyal/gürültü oraının 10 katı olarak kullanılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda LOD 0.15 µg/kg, LOQ 0.48 µg/kg olarak belirlenmiştir.

Hediye Un Fabrikasından alınıp OTA varlığı yönünden uygun olduğu analizlerle tespit edilen un numuneleri geri kazanım çalışmaları için kullanılmıştır.

5 µg/kg konsantrasyondaki örneklerin ortalama geri kazanım değeri %78.4, 10 µg/kg için de ortalama geri kazanım değerleri %92.85 olarak belirlenmiştir. HPLC cihazında okunan 5 µg/kg ve 10 µg/kg' lık geri kazanım kromatogram görüntüsü sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3' de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Geri kazanım kromatogram görüntüsü (5 µg/kg)



Şekil 4.3. Geri kazanım kromatogram görüntüsü (10 µg/kg)

Geri kazanım verileri için 2018/10 numaralı Türk Gıda Kodeksi Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği (30361 sayılı Resmi Gazete, 2018)' nde ve Avrupa Komisyonu (Avrupa Komisyonu, 2006a)' nda yer alan

OTA için performans kriterlerine göre değerlendirilmiş olup bu kriterler Çizelge 4.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. OTA için performans kriteri (TGK, 2018)

Limit (µg/kg)	OTA[1]		
	RSDr[2]	RSDR[3]	Geri Kazanım (%)
<1	≤40	≤60	50-120
≥1	≤20	≤30	70-110

[1]: OTA: Okratoksin A
[2]: RSDr: Rölatif standart sapma
[3]: RSDR: Bağıl rölatif standart sapma

Çalışmada kullanılan OTA konsantrasyonları ≥1 olduğu için geri kazanım oranları %70-110 arasında olmalıdır. 5 µg/kg ve 10 µg/kg konsantrasyondaki örneklerin ortalama geri kazanım değerleri sırasıyla %78.4, %92.85 tespit edilmiş, elde edilen bu geri kazanım sonuçları hem Türk Gıda Kodeksi hem de Avrupa Komisyonu tarafından belirlenen performans kriteri değerlerine uygun bulunmuştur.

4.3. Bazlama Ekmeği Yapımında Hamur Yoğurma ve Fermentasyon Süresinin OTA Miktarına Etkisi

Yapılan çalışmada, OTA ile kontamine olmuş unla yapılan bazlama ekmeğinde, üretim prosesi boyunca başlangıçta unda bulunan OTA miktarındaki değişim araştırılmıştır. Öncelikle bazlama ekmeğinde kullanılacak olan un 5 µg/kg ve 10 µg/kg düzeylerinde OTA ile kontamine edilmiştir. Sonra üretim sürecinde yoğurulan hamurdan yani hiç fermente edilmeyen hamurdan, 1.5 (90 dakika) ve 3 saat (180 dakika) fermentasyona bırakılan hamurlardan(hamur-1, hamur-2) örnekler alınarak toksin konsantrasyonları incelenmiştir. Hamurun yoğurulması ve farklı fermentasyon süreleri (1.5 ve 3 saat) sonucunda OTA' da meydana gelen değişim Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Hamurun yoğurulması, farklı fermentasyon süresi (1.5 ve 3 saat) uygulanan hamur ve bazlama örneklerinin OTA değerleri

Örnek Adı	5 µg/kg			10 µg/kg			*P**
	Ort±SE	*Min-Max*	%95 (ci)	*Ort±SE*	*Min-Max*	%95 (ci)	
Hamur-0	3.691± 0.098[a]	3.495-3.795	0.421	6.444±0.176[a]	6.096-6.661	0.756	0.003
Hamur-1	3.537±0.114[ab]	3.316-3.693	0.489	5.784±0.228[ab]	5.337-6.090	0.983	0.016
Hamur-2	3.363±0.177[ab]	3.010-3.546	0.760	5.259±0.189[bc]	4.895-5.530	0.814	0.009
Bazlama-1	3.114±0.090[ab]	2.953-3.265	0.388	5.376±0.202[bc]	4.997-5.687	0.869	0.014
Bazlama-2	2.963±0.138[b]	2.691-3.138	0.594	4.595±0.209[c]	4.190-4.884	0.898	0.023

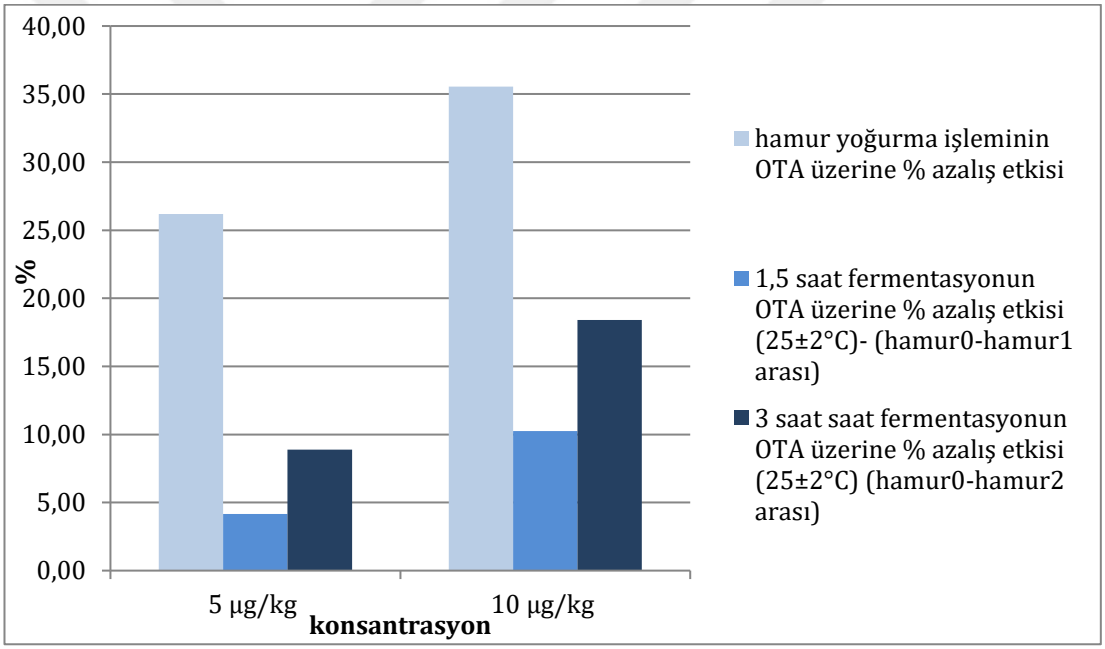
Hamur-0: fermentasyona bırakılmayan hemen yoğruma sonrası alınan hamur örneği
Hamur-1: 1.5 saat fermentasyona bırakılan hamurdan alınan örnek
Hamur-2: 3 saat fermentasyona bırakılan hamurdan alınan örnek
Bazlama-1: 1.5 saat fermentasyona bırakıldıktan sonra pişirilen bazlama örneği,
Bazlama-2: 3 saat fermentasyona bırakıldıktan sonra pişirilen bazlama örneği
*: 5 µg/kg ve 10 µg/kg başlangıç OTA ilaveli hamur gruplarının aynı ürüne dönüştükten sonraki OTA düzeylerinin karşılaştırılmasına yönelik t-test sonucu.
Aynı sütunda farklı harfler ile işaretlenmiş ortalamalar arasında istatistiksel farklılık belirlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.2' den de görülebileceği gibi; unun 5 µg/kg'lik OTA ile kontamine edilmesi sonrasında yoğrulan hamur kitlesinden (hiçbir fermentasyona tabi tutulmadan yani yoğurma biter bitmez) alınan hamur örneğinde (hamur-0) tespit edilen OTA miktarı 3.691 µg/kg, bu hamurun 1.5 saat ve 3 saat fermentasyona bırakılması sonrasında alınan hamur örneklerinde (hamur-1 ve hamur-2) ise sırasıyla 3.537 ve 3.363 µg/kg olarak belirlenmiştir. Bu 3 fermentasyon süresi bakımından örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Sonuç olarak bazlama ekmeği yapımında kullanılan unun 5 µg/kg'lik (düşük konsantrasyonda) OTA ile kontamine olması durumunda fermentasyon uygulanıp uygulanmamasının ya da fermantasyon süresinin kısa (1.5 saat) ya da uzun olmasının (3 saat) bu kontaminasyonu azaltma yönünde bir etkisinin olmayacağı bulgusuna ulaşılmıştır.

Unun 10 µg/kg'lik OTA ile kontamine edilmesi sonunda gerçekleştirilen bazlama ekmeği yapım süreçlerinden olan hamur fermentasyonunun OTA miktarı üzerine etkisini belirleyebilmek amacıyla yapılan ölçümler sonucunda OTA miktarı hiç fermentasyon işlemine tabi tutulmayan hamur örneğinde (hamur-0) 6.444 µg/kg, 1.5 saat hamur fermentasyonu sonunda 5.784 µg/kg (hamur-1), 3 saat hamur fermentasyonu sonunda ise 5.259 µg/kg (hamur-2) olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.2'den de görülebileceği gibi 0 ve 1.5 fermantasyon süreleri ile 1.5 ve 3 saat fermentasyon süreleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmez iken, 0 ve 3 saat fermentasyon süresi arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Sonuç olarak

bazlama ekmeği yapımında kullanılan unun 10 µg/kg'lik (yüksek konsantrasyonda) OTA ile kontamine olması durumunda fermentasyon süresinin uzamasının OTA konsantrasyonunu azaltma yönünde bir etkisinin olacağı bulgusuna ulaşılmıştır.

OTA konsantrasyonunun % azalışı incelendiğinde, 5 µg/kg ve 10 µg/kg OTA ile kontamine olan unun, bazlama ekmeği formülasyonuna göre yoğurulması sonucu OTA konsantrasyonunun sırasıyla % 26.2 ve % 35.56 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.4). Bu azalma formülasyonda kullanılan malzemelerin (özellikle su) ilavesi ile meydana gelen seyrelmeden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.4. Hamur yoğurma ve fermentasyonun OTA seviyesi üzerine % etkisi

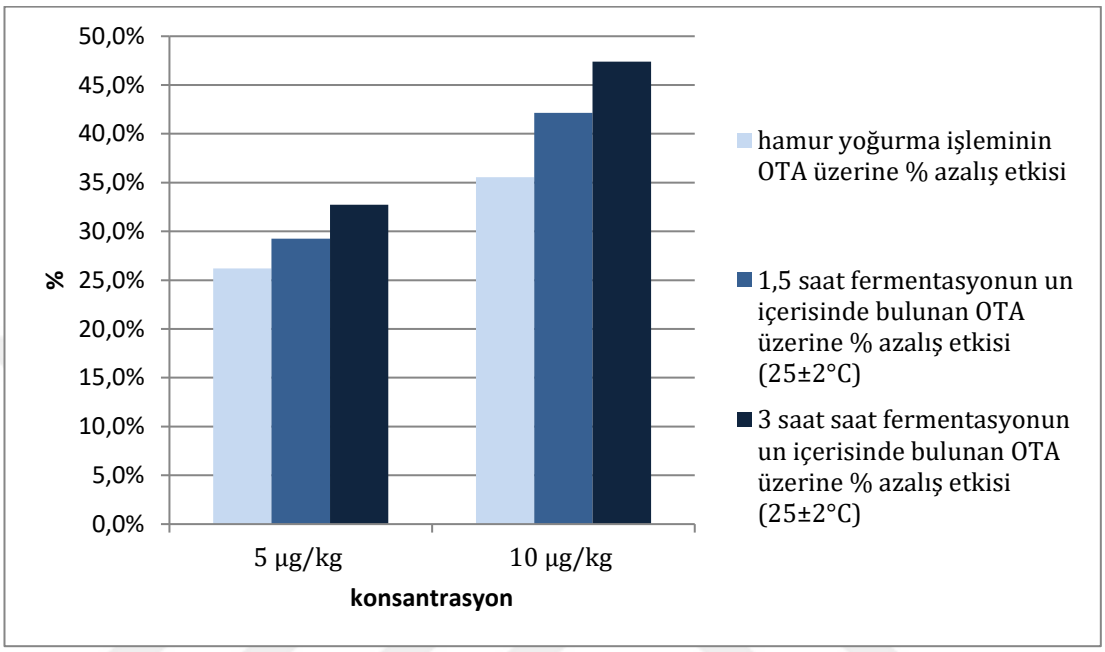
Şekil 4.4' te 5 µg/kg un ile kontamine edilmiş hamurların 1.5 saat fermentasyonu sonucu (hamur-0, hamur-1 arasında) OTA konsantrasyonu % 4.17 oranında, 3 saat fermentasyonu sonucunda (hamur-0, hamur-2 arasında) %8.88 oranında azaldığı görülmektedir. Azalma oranlarının hamur-1 ve hamur-2 arasında yaklaşık iki katı azalma görülse bile bu oran istatiksel olarak önemli bulunmamıştır($p>0.05$). Şekil 4.4' te 10 µg/kg un ile kontamine edilmiş hamurların 1.5 saat fermentasyonu sonucu (hamur-0, hamur-1 arasında) OTA

konsantrasyonu %10.24 oranında 3 saat fermentasyonu sonucunda (hamur-0, hamur-2 arasında) %18.4 oranında azaldığı görülmektedir. 5 µg/kg' daki gibi yaklaşık 2 katı oranında azalma belirlenmiştir ve hamur-0 hamur-2 arasında istatiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Özet olarak; 5µg/kg konsantrasyondaki unla yapılan bazlama hamurunda 0, 1.5 ve 3 saatlik, 10 µg/kg konsantrasyonda ise 0 ve 1.5 saatlik fermentasyonun etkisi önemli bulunmazken, 10 µg/kg konsantrasyonda 3 saatlik fermentasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Düşük konsantrasyon seviyesinde toksin bulunduran hamura fermantasyon süresinin uzamasının herhangi bir etkisi olmamışken, yüksek konsantrasyonda toksin bulunduran hamura fermentasyon süresinin uzamasının etki ettiği gözlenmiştir. Bu durumda başlangıçta bulunan toksin miktarına bağlı olarak fermentasyon süresinin uzamasının OTA miktarında önemli bir düşüş sağlayacağı söylenebilir. Bu bağlamda sektörde bazlama ve/veya diğer ekmek çeşitlerinde kullanılacak olan unlarda OTA bulaşısı olması durumunda 5 µg/kg gibi düşük konsantrasyonlardaki undan yapılan hamurun fermentasyon sürecinden etkilenmeyeceği belirlenmiş olup üreticilere bu konuda dikkatli olmaları yönünde bir öneri de bulunulabilir.

Çizelge 4.2'de iki farklı konsantrasyon (5 µg/kg ve 10 µg/kg) ayrı ayrı incelendiğinde; t testine göre farklı fermentasyon süreleri arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Yoğurulduktan sonra hiç fermentasyona bırakılmayan bazlama hamurunun (hamur-0) 5 µg/kg OTA ile kontamine edilmiş undan yapılması durumunda OTA miktarı 3.691 µg/kg (%26.2 azalma hamurda başlangıçta eklenen miktara göre) iken 10 µg/kg OTA ile kontamine edilmiş undan yapılması durumunda 6.444 µg/kg (%35.56 azalma hamurda başlangıçta eklenen miktara göre) olarak tespit edilmiştir. 1.5 saatlik fermentasyon uygulanması durumunda OTA miktarı (hamur-1) 5 µg/kg için 3.537 µg/kg (%29.26 azalma hamurda başlangıçta eklenen miktara göre), 10 µg/kg için 5.784 µg/kg (%42,16 azalma hamurda başlangıçta eklenen miktara göre) olarak, 3 saatlik fermentasyon uygulanması durumunda OTA miktarı (hamur-2) 5 µg/kg için 3.363 µg/kg (%32.74 azalma hamurda başlangıçta

eklenen miktara göre), 10 µg/kg için 5.259 µg/kg (%47.41 azalma hamurda başlangıçta eklenen miktara göre) olarak belirlenmiştir. Başlangıçta una eklenen toksin miktarına göre OTA seviyesindeki % azalma ise Şekil 4.5' te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Başlangıçta unda bulunan OTA miktarına göre fermentasyonun % etkisi

Şekil 4.5' ten görülebileceği gibi farklı konsantrasyonda (5 ve 10 µg/kg) toksin bulunduran unların % OTA azalmaları farklılık göstermiştir. İstatistiksel olarak belirlenen bu farklılık başlangıçta unda bulunan OTA konsantrasyonuyla ilişkili olup, OTA konsantrasyonunun ne kadar az oranda ise bazlama yapım aşamaları sonunda bu oran daha alt seviyelere inmesinden kaynaklanmakta, toksin yükü fazla olan unlarda fermentasyonla beraber % OTA kaybının daha çok gerçekleştiğini göstermektedir. Bu bulgular ışığında yüksek oranlarda OTA ile kontamine olmuş undan yapılan bazlama hamurlarında fermentasyon süresi arttıkça tespit edilen OTA miktarının azaldığını söylemek mümkün olup uzun fermentasyon sürelerinin kontaminasyon yükü fazla olan unlardan üretilen hamurlarda yararlı sonuçlar sağlayacağı kanaatine ulaşılmıştır.

Una OTA ilavesi yapılarak ekmek yapımının OTA üzerindeki etkisini inceleyen Valle-Algarra vd. (2009), 30^0C'de 60 dakika hamur fermantasyonu sırasında

OTA'nın ortalama azalma miktarlarını 2 µg/kg için %33.5, 5 µg/kg için %29.8 ve 10 µg/kg için ise %30 oranında önemli bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Savaş (2016), yaptığı çalışmada 29-30^{0}C'de 75 dakika boyunca fermente edilen hamurdaki azalmanın una eklenen toksin miktarına göre 5 µg/kg ve 10 µg/kg için sırasıyla ortalama % 51.08, %36.27 olduğunu azalmanın önemli ölçüde tespit edildiğini bildirmiştir. Cecchini vd., (2006), şarabın alkol fermentasyonu sırasında ortamdaki OTA seviyesinin önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir. Ekmek yapımı sırasında maya miktarının ve fermentasyon sıcaklığı gibi farklı değişkenlerin OTA üzerindeki etkisini inceleyen Mozaffary vd. (2019); maya (*S. cerevisiae*) miktarının ve fermantasyon sıcaklığının artmasıyla, OTA azalmasının %31.17' den %59.41' e yükselmesine sebep olduğunu açıklamışlardır. Milani ve Heidari (2017)'nin ekmek yapımı sırasında Okratoksinin stablitesini incelediği araştırmada 30^{0}C'de 90 dakika süreyle ekşi hamur ile ilk fermentasyondan sonra OTA 'nın azalma yüzdesi %9.09 olarak bulmuştur. Ekşi mayanın OTA stabilitesi üzerinde etkili olmadığı tespit etmiştir ancak maya türleri de kullanılan araştırmada sıkıştırılmış mayanın fermentasyonda önemli OTA düşüşüne sebep olduğunu bildirmiştir. OTA yıkımındaki fermentasyon etkisini, pH' da ki düşüşe ve fermentasyon sonrası metabolit üretme yeteneğine sahip CO_2 üreten maya türlerinin varlığıyla ilişkilendirmiştir. Vidal vd. (2014b), ekmek yapımında ekşi maya kullanımıyla OTA' nın değişimini araştırmış, hamurun fermentasyonu sırasında OTA konsantrasyonunda hafif bir azalma (%29) tespit etmiştir. Scudamore vd. (2003) ve Vidal vd. (2014b), yapmış oldukları araştırmalarda hamur fermentasyonu sırasında OTA'nın stabilitesinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada 1.5 saat ve 3 saatlik fermentasyonun düşük konsantrasyondaki OTA üzerinde etki etmemiş olması Scudamore vd. (2003) ve Vidal vd. (2014b)' nin yapmış oldukları araştırmalarla benzerlik göstermektedir. Yüksek konsantrasyonda uzun süren fermentasyonun etki etmiş olması da Mozaffary vd. (2019)' nin çalışmasına benzerlik göstermektedir.

Laktik asit bakterilerinin (Shetty ve Jespersen, 2006) ve mayaların neden olduğu fermantasyon sırasında OTA konsantrasyonundaki azalmanın fermentasyona dahil olan suşa bağlı olduğu bulunmuştur (Westby vd., 1997;

Cecchini vd., 2006), aynı zamanda Mozaffary vd. (2019) maya miktarına ve fermentasyon sıcaklığına bağlı olduğunu; Berthiller vd. (2013) ise fermentasyon sırasında kullanılan mikroorganizmaların, toksinleri, tespit edilemeyecek bir forma dönüştürdüğünü bildirmiştir. Bu nedenle mikotoksinlerin bağlanmasının moleküler anlamda temelini anlamak önem kazanmıştır (Shetty ve Jespersen, 2006).

Bağlanma kimyası üzerine yapılan çalışmalar hücre duvarı yüzeyinde bulunan polisakkarit kısmının hem maya *(S. cerevisiae)* hem de laktik asit bakterilerinde toksinlerin yüzeye bağlanmasında önemli rol oynadığını göstermiştir. Ama genel olarak yapılarındaki temel farklılıklar, toksini bağlama kapasitesi ve gücü olarak farklı yetenek sergilediklerini göstermiştir (Shetty ve Jespersen, 2006). Abedi vd. (2022) yaptıkları çalışmada laktik asit bakterileri ile OTA' nın (10 µg/kg) bağlanma kapasitesi ve stabilitesini araştırmış; sonuçta bağlanmanın çok sayıda faktöre, yani suş, toksin seviyesi, hücre hidrofobikliği, pH değeri ve bakteri canlılığı gibi birçok faktöre bağlı olduğunu tespit etmişlerdir.

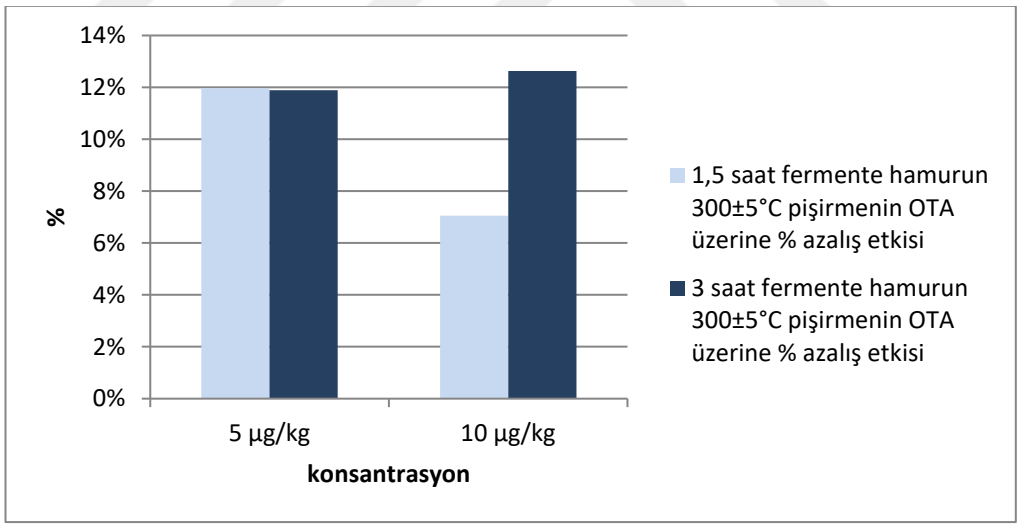
Yapılan çalışmada 5µg/kg konsantrasyondaki unla yapılan bazlamada 1.5 saatlik ve 3 saatlik fermentasyonun etkisi görülmezken, 10 µg/kg konsantrasyondaki unla yapılan bazlamada 3 saatlik fermentasyonun etkisinin görülmesi toksin seviyesinin artmasıyla birlikte laktik asit bakterilerinin OTA' yı bağlama oranını artırdığını ve bu sayede OTA stabilitesindeki düşüşü tespit edebileceğini göstermiştir.

4.4. Bazlama Örneklerinde Pişirme İşleminin OTA Miktarına Etkisi

Yapılan çalışmada, fermenteasyon sonrası pişirilen bazlamalardan (bazlama-1, bazlama-2) örnekler alınarak toksin konsantrasyonları incelenmiştir. Pişirme işlemi sonucunda OTA' da meydana gelen değişim Çizelge 4.2' de (Bölüm 4.3) verilmiştir. Çizelge 4.2'den de görülebileceği gibi; unun 5 µg/kg OTA ile kontamine edilmesi sonrasında yoğurulup 1.5 ve 3 saat fermentasyona bırakılan hamurların pişirilmesi sonrasında tespit edilen OTA seviyeleri bazlama-1 için 3.114 µg/kg, bazlama-2 için 2.963 µg/kg; 10 µg/kg OTA ile kontamine edilmesi

sonrasında yoğurulup 1.5 ve 3 saat fermentasyona bırakılan hamurların pişirilmesi sonrasında tespit edilen OTA seviyeleri bazlama-1 için 5.376 µg/kg, bazlama-2 için 4.595 µg/kg olarak belirlenmiştir. OTA konsantrasyonuna 300 ± 5^0C' de 10 dakika pişirme işleminin etkisi (hamur-1'den bazlama-1'e; hamur-2'den bazlama-2'ye geçerken) hem 5µg/kg ve hem 10 µg/kg için incelendiğinde istatiksel olarak fark bulunmamıştır ($p<0.05$). OTA' nın kararlı yapısı nedeniyle ısıya karşı stabil olduğu ve erime noktasının 169^0C olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, üretim prosesinde uygulanan 300 ± 5^0C' de 10 dakika pişirme işleminin OTA seviyesi üzerinde bir miktar azalışı gözlemlense de bu azalmanın istatiksel olarak etkili olmadığı görülmüş, 10 dakika sürenin OTA' yı düşürmede yeterli gelmediği; OTA' nın yüksek termostabiliteye sahip olması nedeniyle, pişirme esnasında OTA içeriğinde önemli bir artış ya da azalışa sebep olmadığı belirlenmiştir.

Pişirme işleminin OTA üzerine % etkisi Şekil 4.6' te verilmiştir.

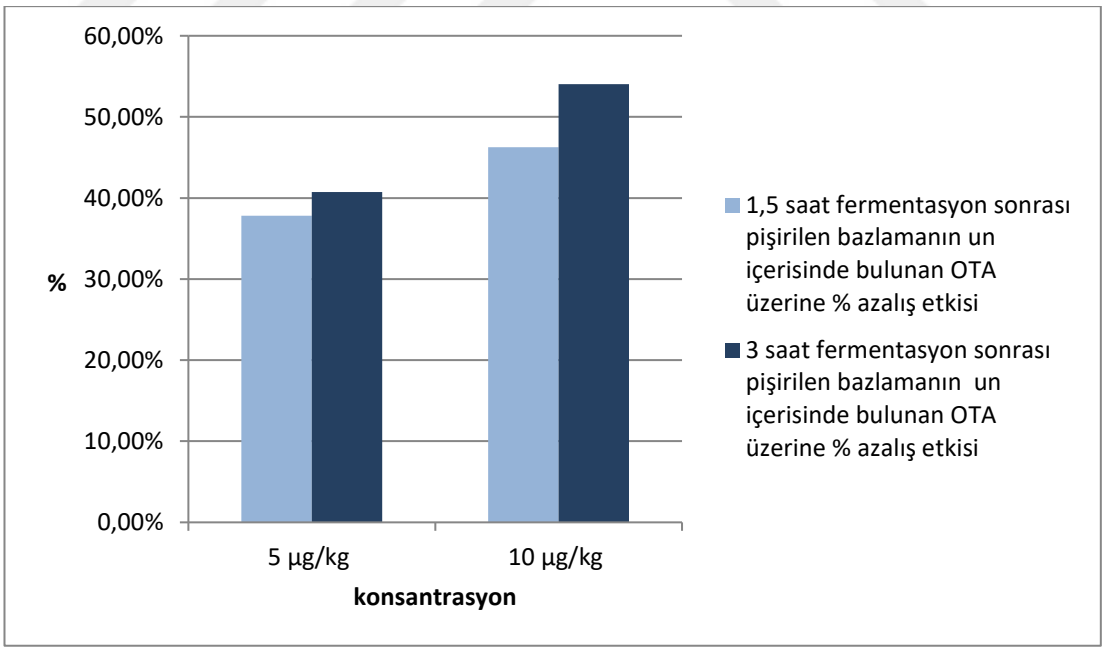


Şekil 4.6. Pişirme işleminin OTA seviyesi üzerine % etkisi

Şekil 4.6' te 5 µg/kg un ile kontamine edilmiş hamurlardan 1.5 saat fermentasyona bırakılarak pişirilen bazlama ekmeklerinin OTA konsantrasyonu % 11.96 oranında 3 saat fermentasyon sonrası pişirilen bazlama ekmeklerinin OTA konsantrasyonu %11.89 oranında azaldığı görülmekte; 10 µg/kg un ile kontamine edilmiş hamurlardan 1.5 saat fermentasyona bırakılarak pişirilen

bazlama ekmeklerinin OTA konsantrasyonu % 7.05 oranında 3 saat fermentasyon sonrası pişirilen bazlama ekmeklerinin OTA konsantrasyonu %12.63 oranında azaldığı görülmektedir.

Çizelge 4.2'de iki farklı konsantrasyon (5 µg/kg ve 10 µg/kg) ayrı ayrı incelendiğinde; t testine göre farklı fermentasyon sürelerine tabi tutulan bazlamaların pişirilmeleri arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). 1.5 saatlik fermentasyon uygulanması sonucu pişirilen bazlamaların OTA miktarı (bazlama-1) 5 µg/kg için 3.114µg/kg (%37.8 azalma hamurda başlangıçta eklenen miktara göre), 10 µg/kg için 5.375 µg/kg (%46.24 azalma hamurda başlangıçta eklenen miktara göre) olarak, 3 saatlik fermentasyon uygulanması durumunda OTA miktarı (bazlama-2) 5 µg/kg için 2.963 µg/kg (%40.74 azalma hamurda başlangıçta eklenen miktara göre), 10 µg/kg için 4.595 µg/kg (%54.05 azalma hamurda başlangıçta eklenen miktara göre) olarak belirlenmiştir. Başlangıçta una eklenen toksin miktarına göre OTA seviyesindeki % azalma ise Şekil 4.7' te gösterilmiştir



Şekil 4.7. Başlangıçta unda bulunan OTA miktarına pişirmenin % etkisi

İstatiksel olarak tespit edilen bu farklılık başlangıçta unda bulunan OTA konsantrasyonuyla ilişkili olup, düşük OTA konsantrasyonun bazlama yapımı

aşamasında daha alt seviyeye inmesinden, yüksek OTA konsantrasyonun ise daha üst seviyelerde kalmasından kaynaklanmaktadır.

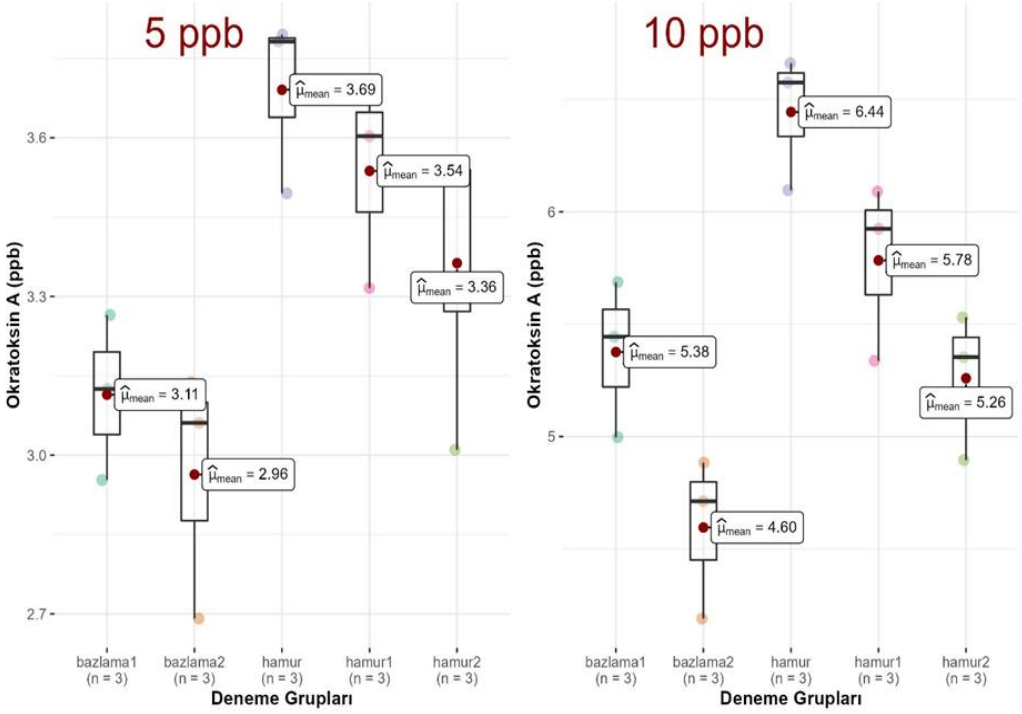
Boudra vd. (1995) tarafından OTA ile kontamine olmuş buğdayın farklı sıcaklık ve nem koşullarındaki stabilitesi incelenmiş; araştırma sonucunda termal işlem uygulamanın toksini tamamen ortadan kaldırmadığı ancak OTA konsantrasyonunda %50' den fazla azalma olduğu belirlenmiştir. Valle-Algarra vd. (2009), 2 µg/kg, 5 µg/kg ve 10 µg/kg seviyesinde kirletilmiş un numunesinden elde edilen hamuru, fermentasyondan sonra farklı sıcaklık/zaman kombinasyonlarında (190^0C/50 dk, 207^0C/40 dk, 223^0C/35 dk ve 240^0C/30 dk) pişirme işlemine tabi tutmuştur. Sonuçta farklı sıcaklık/zaman uygulamaları arasında toksin konsantrasyonundaki azalmada önemli bir fark görülmediğini bildirmişlerdir. Araştırma verileri incelendiğinde ortalama azalma oranlarının 2 µg/kg için %39, 5 µg/kg için %38, 10 µg/kg için % 22.75 olarak değerlendirilmiş, OTA düzeyinde pişirmenin etkisinin ortalama azalma değeri %32.9 olarak belirtilmiştir. Savaş (2016), 240±5^{0}C 30 dakika ekmek pişirme işleminden sonra 5 µg/kg konsantrasyonu için OTA seviyesi %53.3 oranında, 10 µg/kg konsantrasyonu için %49.5 oranında azaldığını bildirmiştir. Mozaffary vd. (2019) ekmek yapımı sırasında pişirme esnasındaki OTA kaybını %19.21 olarak bulmuştur. Bryła vd. (2021), çavdar ekmeği ve pizza bazı üretim esnasında OTA konsantrasyonundaki azalmayı 180^0C'de pişirilen ekmek için %25.6, 240^0C'de pişirilen ekmek için %23, 320^0C'de pişirilen pizza bazı için %8 ve 370^0C'de pişirilen pizza bazı için %25.4 olarak belirlemişlerdir. Yapılan bazı çalışmalarda mikotoksinin yüksek sıcaklıklarda stabil olduğu ve ısıtma esnasında azalmadığı bulunmuş (Osborne vd. 1996; Scudamore vd., 2003; Vidal vd., 2014b; Milani ve Heidari; 2017), bazılarında ise Okratoksin konsantrasyonunda artış tespit etmişlerdir (Vidal vd., 2014a; Peng vd., 2015; Yu vd., 2020; Khaneghah vd., 2022). Vidal vd. (2014a)' nin çalışmasında hamurdan ekmeğe geçişte OTA' da % 40'lık bir artış meydana gelmiştir. Peng vd. (2015), Çin buğulanmış ekmeği üretim prosesinde ki OTA akıbetini belirlemek için yaptıkları çalışmada, hamur, fermente hamur ve ekmekteki OTA konsantrasyonunu araştırmışlardır. Yoğurulmuş, fermente edilmiş hamurdaki ve buğulanarak pişirilmiş ekmekteki OTA seviyeleri benzer bulunmuş olsa da,

una kıyasla %11-16 aralığında arttığı tespit edilmiştir. Bu artışın enzimatik dönüşümle veya OTA' nın enzimatik hidrolizine bağlı olduğu bildirmişlerdir. Yu vd. (2020) OTA içeren üzüm posası ve unu yoğurup kurabiye hamuru yapmış ve pişirme sonrası OTA' da meydana gelen değişimi incelemiştir. Kurabiyedeki OTA içeriğinin hamurdaki OTA' dan %45.4- 69.8 fazla olduğu tespit edilmiştir. Khaneghah vd., (2022), araştırmalarında kraker hamurundan pişirme aşamasına geçerken OTA düzeyinde önemli düzeyde artış olduğunu, gıda işleme aşamasının toksinlerin gıda matrisi ile etkileşime geçmesine ve gizli mikotoksinlerin serbest hale geçmesine sebep olduğunu bildirmiştir. Pişirme işlemi sırasında (fermente hamurdan krakere) ortalama OTA seviyesindeki önemli düzeydeki artış, unda gizli OTA' nın salınmasından, OTA matrisinin bozunmasından ya da değiştirilmesinden kaynaklandığını açıklamıştır.

Çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmuş olması, araştırma bulgularını karşılaştırmayı da zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda formülasyondaki farklılıklar, hamurun havalandırılması, hamurun şekli, boyutu, yüksekliği, fermentasyona sebep olan suş ve miktarı, pişirme sıcaklıklarının farklılığı, pişirme süresi ekmek üretimi boyunca OTA düşüşüne sebep olan faktörlerdendir. Çelik (2008), okratoksinlerin kimyasal yapılarında bulunan dihidroizokumarin ve fenilalanin bileşikleri, birbirlerine amid bağı ile bağlanırlar bu da ısıya ve hidrolize karşı çok kararlı bir yapı kazanmalarına neden olduğunu bildirmiştir. Tosun (2015), bu kararlı hali gıda işleme aşamalarında da (kaynatma, fermentasyon, pişirme, kızartma, sıcaklık uygulama gibi) koruduklarını açıklamıştır. Bu çalışmada pişirmenin OTA konsantrasyonu üzerine etki etmemiş olması Osborne vd. (1996) Scudamore vd. (2003), Valle-Allegra vd. (2009), Milani ve Heidari (2017) 'nin çalışmasıyla benzerlik göstermektedir.

Bazlama ekmeği üretimi esnasında hamur, 1.5 saat ve 3 saat fermente hamur (hamur-1 ve hamur-2) ve sırasıyla bunlardan üretilen bazlama ekmekleri (bazlama-1 ve bazlama-2) arasında 5 µg/kg konsantrasyondaki OTA düzeyi için en yüksek hamur grubunda, en düşük oranda ise bazlama-2 de gözlemlenmiştir

(Şekil 4.8). 10 µg/kg OTA düzeyinde de 5 µg/kg' ye benzer şekilde en yüksek hamur grubunda en düşük oranda ise bazlama-2 de gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Bazlama yapımı sırasında OTA miktarındaki değişim (ppb= µg/kg)

4.5. Bazlama Örneklerinde Depolama İşleminin OTA Miktarına Etkisi

5 ve 10 µg/kg konsantrasyonda toksin kirletilmiş unla yoğurulup farklı fermentasyon sürelerinde tutulan ve pişirilen bazlama ekmeklerinde 25±5^{0}C 0, 5 ve 10 gün depolamanın OTA düzeyindeki etkisi Çizelge 4.3' de verilmektedir.

Çizelge 4.3. Fermantasyon ve depolama sürelerinin OTA düzeylerine etkisi

Ferm. süresi (saat)	Dep. süresi (gün)	OTA düzeyi						*p
		5µg/kg			10 µg/kg			
		Ort±SE	*Min-Max*	%95 (ci)	*Ort±SE*	*Min-Max*	%95 (ci)	
1.5	0	3.114±0.090	2.953-3.265	0.388	5.376±0.202	4.997-5.687	0.869	0.008
	5	2.866±0.127	2.717-3.119	0.548	5.132±0.177	4.872-5.358	0.764	0.002
	10	2.740±0.106	2.628-2.953	0.458	4.938±0.169	4.615-5.186	0.727	0.003
3.0	0	2.963±0.138	2.691-3.138	0.594	4.595±0.209	4.190-4.884	0.898	0.014
	5	2.755±0.115	2.640-2.985	0.495	4.301±0.162	4.001-4.556	0.696	0.007
	10	2.672±0.090	2.564-2.851	0.387	3.964±0.089	3.840-4.136	0.382	0.002

*: Aynı fermentasyon süresine tabi tutulan başlangıç OTA düzeyi 5µg/kg ve 10 µg/kg olan ürünlerin aynı depolama süresi sonundaki ortalama OTA düzeylerinin karşılaştırılmasına yönelik t-test sonucu.
Aynı sütunda farklı harfler ile işaretlenmiş ortalamalar arasında istatistiksel farklılık belirlenmiştir (p<0,05).

Başlangıçta 5 µg/kg OTA ilave edilen ürünlerin 1.5 saat ve 3 saat fermantasyonlarından sonraki elde edilen bazlamaların depolama sürelerine göre OTA düzeyleri arasında istatistiksel farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). (Çizelge 4.3). Başlangıçta 10 µg/kg OTA ilave edilen ürünlerin 1.5 saat ve 3 saat fermantasyonlarından sonraki elde edilen bazlamaların depolama süreleri sonucunda (0, 5 ve 10. gün) ölçülen ortalama OTA düzeyleri arasında istatistiksel farklılık ($p>0,05$) bulunmamıştır (Çizelge 4.3). Bu durumda bazlama ekmeklerini oda koşullarında 10 güne kadar depolamanın hem 5 µg/kg, hem 10 µg/kg' lik OTA konsantrasyonu üzerinde miktarsal olarak azalma gözükse de istatiksel olarak etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

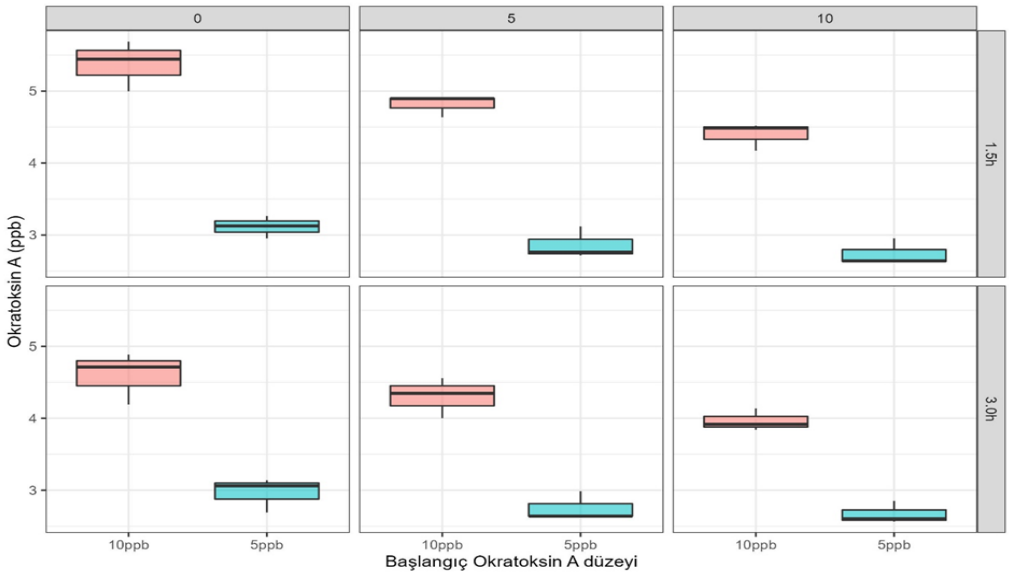
Çizelge 4.3' de iki farklı konsantrasyon (5µg/kg ve 10 µg/kg) ayrı ayrı incelendiğinde, 1.5 ve 3 saatlik fermantasyona tabii tutulup pişirilen bazlama ekmeklerinin OTA analiz sonucu konsantrasyon oranları 0, 5 ve 10 günlük depolama süresinde t testine göre işlem basamakları arasında istatistiksel farklılık göstermiştir ($p<0.05$). İstatiksel olarak tespit edilen bu farklılık başlangıçta unda bulunan OTA konsantrasyonuyla ilişkili olup, düşük OTA konsantrasyonun bazlamanın depolanması aşamasında daha alt seviyeye inmesinden, yüksek OTA konsantrasyonun ise daha üst seviyelerde kalmasından kaynaklanmaktadır.

1.5 saat fermantasyon süresinde depolama günü ve fermantasyon süresinin deneme sonu OTA düzeylerine müşterek ilişkisi (interaksiyon) 0 ve 10. gün arasında istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$), diğer karşılaştırmalarda önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur. 3 saat fermantasyon süresinde depolama günü ve fermantasyon süresinin deneme sonu OTA düzeylerine müşterek ilişkisi (interaksiyon) 0 ve 10. gün arasında istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$), diğer karşılaştırmalarda önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur.

Abedi vd. (2022) canlı olmayan laktik asit bakteri suşlarının gıdadaki OTA' yı detoksifiye edebileceğini belirtmiş, Piotrowska (2014) ise canlı olmayan (inaktive) laktik asit bakterilerinin ortamdaki OTA' yı %46.2 ila %59.8 oranında azaltığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda toksin

bulundururan ve iki farklı fermentasyon sonrası elde edilen bazlamaların az da olsa OTA seviyesinde düşüş olması, ölü laktik asit bakterilerinin ortamdaki OTA'yı azaltmaya devam ettiği buna rağmen mikotoksinin stabilitesini hala koruduğunu göstermektedir. Ayrıca Berthiller vd. (2013), mikotoksinlerin, gıda işleme sırasında (fermentasyon, pişirme gibi) meydana gelen biyolojik ve kimyasal reaksiyonlarla yapılarının değiştiğini ve geleneksel analitik yöntemlerle tespit edilemez hale geldiğini bildirmiştir. Bu da OTA seviyesinde azalmaya sebep olmuş gibi görünmelerine yol açmaktadır.

1.5 saatlik fermantasyon sonrası pişirilen ekmeklerin depolama süresinin artması hem 5 µg/kg hemde 10 µg/kg grupta ortalama OTA düzeyinde düşüşe neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). Benzer şekilde 3 saatlik fermantasyon sonrası pişirilen bazlama ekmeklerinde de depolama süresinin artması hem 5 µg/kg hemde 10 µg/kg grupta ortalama OTA düzeyinde düşüşe neden olmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Depolama sürelerinin OTA düzeylerine etkisi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada farklı düzeyde OTA ile kontamine edilmiş unla üretilen bazlama ekmeğinin, üretim boyunca (hamur yapımı, fermentasyon sonrası (1.5 saat ve 3 saat), pişirme sonrası ve oda koşullarında 10 gün boyunca depolanması sonucunda toksin seviyesindeki değişiklik incelenmiştir.

Unun 5 µg/kg'lik OTA ile kontamine edilmesi sonunda gerçekleştirilen bazlama ekmeği yapım süreçlerinden ortalama OTA azalma yüzdesi sırasıyla (başlangıçta una eklenen OTA' ya göre) hamur yapımı sonunda %26.2, fermentasyon sonrası ortalama %31, pişirme sonrası % 39.2 depolama sonrası ise % 46 oranında tespit edilmiştir. Unun 10 µg/kg'lik OTA ile kontamine edilmesi sonunda gerçekleştirilen bazlama ekmeği yapım süreçlerinden ortalama OTA azalma yüzdesi sırasıyla (başlangıçta una eklenen OTA' ya göre) hamur yapımı sonunda %35.6, fermentasyon sonrası ortalama %44.8, pişirme sonrası % 54.1 depolama sonrası ise % 55 oranında tespit edilmiştir.

Bu çalışmada OTA seviyesinde genel olarak bir azalma tespit edilse de fermentasyon, pişirme ve depolamanın önemli bir etkisi bulunamamıştır. Sadece yüksek konsantrasyonda (10 µg/kg) 3 saat süren fermentasyonun (hamur- hamur2 arasında) etkisi olduğu tespit edilmiştir. OTA seviyesindeki azalma, OTA' nın uygulanan işlemlerde az da olsa azaldığını fakat ortamdan tamamen uzaklaştırılamadığını göstermektedir. Pişirme veya fermentasyon gibi işlemler OTA' nın yapısını bozabilmekte, belki de daha toksik bileşiklere(metabolitlere) dönüşmesine neden olabilmektedir. Bu azalma sadece ürünün uygulanan analiz yöntemiyle bu bileşiklerin (ya da metabolitlerin) tespit edilemediğini göstermekte, bu yönüyle de araştırılmaya açık hale gelmektedir. Ayrıca ekşi maya kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonda; kullanılan laktik asit bakteri türü OTA bağlanmasını etkilediği için; fermentasyon sırasında en etkili olacak mayanın türünün belirlenmesi için ileri bir araştırma yapmak gerekmektedir.

Bazlama ekmeği üretimi esnasında hem 5 µg/kg hem de 10 µg/kg konsantrasyonda (5 µg/kg-3 saat fermentasyon hariç) OTA ilave edilen unlardan üretilen bazlamanın (0. günde), TGK ve Avrupa Komisyonu tarafından kabul edilebilir maksimum limit olan 3 µg/kg' ın üzerinde OTA bulundurduğu tespit edilmiştir. Bazlama ekmeği üretimi sürecinde OTA konsantrasyonunun %45-55 arasında azalmasına rağmen yasal limitlerin üzerinde kalması ve bu şekilde tüketime sunulmasının insan sağlığı açısından uygun olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçla buğdayın un haline gelmeden önce OTA oluşumunun engellenmesi için gerekli çalışmaların yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Gıda maddelerinin ve hayvan yemlerinin OTA ile kontaminasyonu sadece ülkemiz için değil tüm dünyada ciddi bir problemdir. Mikotoksin oranı yüksek gıdaların, oluşturdukları sağlık riski bakımından özel bir önemi vardır. OTA düzeyleri iklimsel ve bölgesel olarak değişmekle beraber bunlardan elde edilen ürünlerin üretim prosesine göre değişiklik göstermektedir. Gıdalarda OTA oluşumunun önlenebilmesi konusunda hasattan önce, hasat sırasında ve hasat sonrasında yapılan hatalarla küf kontaminasyonunun engellenmesi ya da en aza indirilmesi gerekmektedir. OTA oluşmaması için gerekli tedbirler alınıp fiziksel, kimyasal ve biyolojik tekniklerle detoksifikasyon sağlandığında toksin düzeylerinde ciddi oranda azalma görülecektir. Bu da hem sağlık açısından hem de ülke ekonomisi açıdan fayda sağlayacaktır. Amaç mikotoksin kaynaklı tüm riskleri en aza indirmeye çalışmaktır. Gıda üretiminde sağlıklı ürün üretebilmek ve kaliteyi yakalayabilmek için HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point-Kritik Kontrol Noktalarında Tehlike Analizleri) bazlı Engeller Teknolojisi Sistemini esas alan bir bulaşı kontrol stratejisi izlemeli, bunu hasat öncesinden hasat sonrasına kadar yaygınlaştıracak bir düzen içerisinde uygulayabilmek gerekmektedir. Ayrıca ihraç edilen ürünlerde OTA bulunmaması ve buna bağlı RASSF bildirimlerinin düşük olması; günümüz küresel ticaret, ekonomi ve daha da önemlisi tüketici güvenliği gerekliliklerini sağlamak açısından temel bir zorunluluktur.

KAYNAKLAR

Abdulkadar, A. H. W., Al-Ali, A. A., Al-Kildi, A. M., Al-Jedah, J. H., 2004. Mycotoxins in Food Products Available in Qatar. Food Control, 15(7), 543-548.

Abedi, E., Mousavifard, M., Hashemi, S. M. B., 2022. Ultrasound-Assisted Detoxification of Ochratoxin A: Comparative Study of Cell Wall Structure, Hydrophobicity, and Toxin Binding Capacity of Single and Co-Culture Lactic Acid Bacteria. Food and Bioprocess Technology, 15(3), 539-560.

Açu, M., Ocak. Ö. Ö., 2019. Gıdalarda Aflatoksin Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Analiz Yöntemleri. Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 4(2), 168-181.

Algül, I., 2012. Mısır Ununda Aflatoksin, Okratoksin A ve Ağır Metal İçeriklerinin Belirlenmesi ve Kemometrik Olarak Değerlendirilmesi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 90s, Balıkesir.

Alvito, P. C., Sizoo, E. A., Almeida, C. M., Van Egmond, H. P., 2010. Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Baby Foods in Portugal. Food Analytical Methods, 3(1), 22-30.

Anonim, 2022a. Erişim Tarihi: 01.10.2022. http://okanongan.blogspot.com/2015/01/hplc-yuksek-performans-sivi.html

Anonim, 2022b. Erişim Tarihi: 11.09.2022. https://docplayer.biz.tr/226747627-Numune-hazirlama-ekstraksiyon-yontemleri-doc-dr-sebnem-budak.html

AOAC, 2000. Ochratoxin A in Barley Immunoaffinity By Column. Journal of AOAC International, 83: 1377.

Aokin Rapid Analysis Systems, 2022. Erişim Tarihi: 31.08.2022. https://aokin.de/products/columns/?lang=en#1477567403586-98edb337-f4cd70d4-bf2e

Avrupa Komisyonu (European Commission), 2002. Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 Amending Regulation (EC) No 466/2001 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Official Journal, L 75, 18-20.

Avrupa Komisyonu (European Commission), 2004. Commission Regulation (EC) No 683/2004 of 13 April 2004 Amending Regulation (EC) No 466/2001 as Regards Aflatoxins and Ochratoxin A in Foods for İnfants and Young Children. Official Journal, L 106, 3-5.

Avrupa Komisyonu (European Commission), 2005. Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 Amending Regulation (EC) No 466/2001 as Regards Ochratoxin A. (2008). Official Journal, L 25, 3-5.

Avrupa Komisyonu (European Commision), 2006a. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 Laying Down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of the Levels of Mycotoxins in Foodstuffs. Official Journal, L 70, 12-34.

Avrupa Komisyonu (European Commision), 2006b. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum. Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Official Journal, L364, 5.

Avrupa Komisyonu (European Commision), 2010. Commission Regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 Amending Regulation (EC) No 1881/2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs as Regards Ochratoxin A. Official Journal, L 35, 7-8.

Avrupa Komisyonu (European Commision), 2022. Commission Regulation (EU) 2022/1370 of 5 August 2022 Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as Regards Maximum Levels of Ochratoxin A in Certain Foodstuffs. Official Journal, L 206, 11-14.

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), 2022. Erişim Tarihi: 11.08.2022. https://www.efsa.europa.eu/en/news/public-consultation-ochratoxin

Atar, B., 2017. Gıdamız Buğdayın, Geçmişten Geleceğe Yolculuğu. Yalvaç Akademi Dergisi, 2(1), 1-12.

Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews, 16(3), 497–516.

Bento, J. M. V., Pena, A., Lino, C. M., Pereira, J. A., 2009. Determination of Ochratoxin A Content in Wheat Bread Samples Collected From the Algarve and Bragança Regions, Portugal: Winter 2007. Microchemical Journal, 91(2), 165-169.

Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, SD., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I. P., Seefelder, W., Speijers. G., Stroka, J., 2013. Masked Mycotoxins: a Review. Molecular Nutrition and Food Research, 57, 165–186.

Bosco, F., Mollea, C., 2012. Mycotoxins in Food. Valdez, B. (Ed.), In Food Industrial Processes-Methods and Equipment (169-200). IntechOpen, 418p, Torino.

Botton, A., Ferrigo, D., Scopel, C., Causin, R., Bonghi, C., Ramina, A., 2008. A cDNA-AFLP Approach to Study Ochratoxin A Production in *Aspergillus carbonarius*. International Journal of Food Microbiology, 127(1-2), 105-115.

Boudra, H., Le Bars, P., Le Bars, J., 1995. Thermostability of Ochratoxin A in Wheat Under Two Moisture Conditions. Applied and Environmental Microbiology, 61(3), 1156-1158.

Bryła, M., Ksieniewicz-Woźniak, E., Stępniewska, S., Modrzewska, M., Waśkiewicz, A., Szymczyk, K., Szafrańska, A., 2021. Transformation of Ochratoxin A During Bread-Making Processes. Food Control, 125, 107950.

Bullerman, L. B., Bianchini, A., 2007. Stability of Mycotoxins During Food Processing. International Journal of Food Microbiology, 119(1-2), 140-146.

Büyüker, S. M., 2019. Ekmek ve Bazı Tahıl Ürünlerinde Okratoksin A Bulunurluğu ve Toksik Etkileri. Akademik Gıda, 17(2), 300-305.

Cecchini, F., Morassut, M., Moruno, E. G., Di Stefano, R., 2006. Influence of Yeast Strain on Ochratoxin A Content During Fermentation of White and Red Must. Food Microbiology, 23(5), 411-417.

Cengiz, M., Oruç, H. H., Uzunoğlu, İ., Sonal, S., 2007. Ochratoxin A Levels in Different Types of Bread and Flour (Farklı Tip Ekmek ve Unlarda Okratoksin A Düzeyleri). Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 26(1-2), 7-10.

Cengiz, M., 2015. Beslenme Alışkanlıklarının Anne Sütündeki Aflatoksin M1 Varlığı Üzerine Etkisi. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 69s, Erzurum.

Çelik, C., 2008. Adana' da Bazı Marketlerde Satışa Sunulan Çekirdeksiz Kuru Üzümlerde Okratoksin A Varlığının HPLC Yöntemi ile Araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 55s, Adana.

Chung, S. W., Kwong, K. P., 2007. Determination of Ochratoxin A At Parts-Per-Trillion Levels in Cereal Products by Immunoaffinity Column Cleanup and High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Journal of AOAC International, 90(3), 773-777.

Duarte, S. C., Pena, A., Lino, C. M., 2010a. A Review on Ochratoxin A Occurrence and Effects of Processing of Cereal and Cereal Derived Food Products. Food Microbiology, 27(2), 187-198.

Duarte, S. C., Tanello, A., Pena, A., Lino, C. M., Matos, C. D., Oliveira, M. B. P. P., Alves, M. R., 2010b. Evaluation of Ochratoxin A Exposure Degree in Two Portuguese Cities Through Wheat And Maize Bread Consumption During The Winter 2007. Food Control, 21(5), 702-707.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom L., Leblanc, J. C., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Wallace, H., Alexander, J., Dall'Asta, C., Mally, A., Metzler, M., Binaglia, M., Horváth, Z., Steinkellner, H., Bignami, M., 2020. Risk Assessment of Ochratoxin A in Food. EFSA Journal, 18(5), e06113.

El Khoury, A., Atoui, A., 2010. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. Toxins, 2(4), 461-493.

Entwisle, A. C., Williams, A. C., Mann, P. J., Slack, P. T., Gilbert, J., 2000. Liquid Chromatographic Method With İmmunoaffinity Column Cleanup for Determination of Ochratoxin A in Barley: Collaborative Study. Journal of AOAC International, 83(6), 1377-1383.

Emeksizoğlu, B., 2016. Kastamonu Yöresinde Yetiştirilen Siyez (*Triticum Monococcum L.*) Buğdayının Bazı Kalite Özellikleri ile Bazlama ve Erişte Yapımında Kullanımının Araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 154s, Samsun.

Erzurum, K., 2001. Gıdalarda Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler. Gıda, 26(4), 289-293.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2022. Erişim Tarihi: 28.09.2022. https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI

Girgin, G., Başaran, N., Şahin, G., 2001. Dünyada Ve Türkiye'de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 58(3), 97-118.

Gölge, O., Kabak, B., 2016. First report: Exposure Estimates to Ochratoxin A Through Wheat Bread and Rice Intake in Turkey. Journal of Cereal Science, 69, 213-217.

Gürhayta, O. K., Çağındı, Ö., 2015. Kurutulmuş Meyvelerde Aflatoksin ve Okratoksin A Varlığının ve Sağlık Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 12(2), 327-388.

Hayat, A., Paniel, N., Rhouati, A., Marty, J. L., Barthelmebs, L., 2012. Recent Advances in Ochratoxin A-Producing Fungi Detection Based on PCR Methods and Ochratoxin A Analysis in Food Matrices. Food Control, 26(2), 401-415.

IARC (Internatıonal Agency for Research on Cancer), 2022. In‘ IARC Monographs On The Identıfıcatıon Of Carcınogenıc Hazards To Humans. Erişim Tarihi: 15.09.2022. https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications

Iqbal, S. Z., 2021. Mycotoxins in Food, Recent Development in Food Analysis and Future Challenges; a Review. Current Opinion in Food Science, 42, 237-247.

İngök, M. A., Güler K. H. F., 2015. Sıcaklığın *Aspergillus* section Nigri Üyelerinin Okratoksin A Oluşturması Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2(1), 1-8.

Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA), 2001. In: Ochratoxin A, in " Safety evaluations of specific mycotoxins ". Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 6–15 February, Geneva.

Juan, C., Lino, C. M., Pena, A., Moltó, J. C., Mañes, J., Silveira, I., 2007. Determination of Ochratoxin A in Maize Bread Samples by LC With Fluorescence Detection. Talanta, 73(2), 246-250.

Juan, C., Moltó, J. C., Lino, C. M., Mañes, J., 2008a. Determination of Ochratoxin A in Organic and Non-Organic Cereals and Cereal Products From Spain and Portugal. Food Chemistry, 107(1), 525-530.

Juan, C., Pena, A., Lino, C., Moltó, J. C., Mañes, J., 2008b. Levels of Ochratoxin A in Wheat and Maize Bread From the Central Zone of Portugal. International journal of food microbiology, 127(3), 284-289.

Kabak, B., Var, I., 2006. Ülkemiz Açısından Sorun Olan Mikotoksinler ve Riskli Gıda Maddeleri. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 681–684.

Kara, G. N., Ozbey, F., Kabak, B., 2015. Co-occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Cereal Flours Commercialised in Turkey. Food Control, 54, 275-281.

Karagözlü, N., Karapınar, M., 2000. Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Okratoksin-A ve Fungal Kontaminasyon. Turkish Journal of Biology, 24, 561-572.

Kaya, S. B., 2012. Bazı Organik Tarım Ürünlerinde Aflatoksin, Okratoksin A ve Fumonisin Varlığının Araştırılması. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 88s, Manisa.

Keyvan E, Yurdakul Ö., 2015. Çeşitli Gıdalarda Okratoksin A Varlığı. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 3(1), 27-33.

Khaneghah, A. M., Fakhri, Y., Sant'Ana, A. S., 2018. Impact of Unit Operations During Processing of Cereal-Based Products on the Levels of Deoxynivalenol, Total Aflatoxin, Ochratoxin A, and Zearalenone: A Systematic Review and Meta-Analysis. Food Chemistry, 268, 611-624.

Khaneghah, A. M., Mostashari, P., Oliveira, C. A., Vanin, F. M., Amiri, S., Sant'Ana, A. S., 2022. Assessment of the Concentrations of Ochratoxin A, zearalenone, and Deoxynivalenol During Cracker Production. Journal of Food Composition and Analysis, 104950.

Koç, E., 2019. Bazı Gıda Ürünlerinde Kullanılan Renk Maddelerinin Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi ile Tayini ve Optimizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 80s, Isparta.

Koç, N. F., 2016. Adana'da Fırın ve Marketlerde Satışa Sunulan Ekmeklerde Okratoksin A (OTA) Varlığının HPLC Yöntemi ile Araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 59s, Adana.

Liao, C.D., Chıueh, L.C., Yang, D., Shih C., 2008. Determination of Zearalenone in Cereals by High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Journal of Food and Drug Analysis, 17(1), 52–58.

Majeed, M., Khaneghah, A. M., Kadmi, Y., Khan, M. U., Shariati, M. A., 2018. Assessment of Ochratoxin A in Commercial Corn and Wheat Products. Current Nutrition & Food Science, 14(2), 116-120.

Milani, J., Maleki, G., 2014. Effects of Processing on Mycotoxin Stability in Cereals. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(12), 2372-2375.

Milani, J., Heidari, S., 2017. Stability Of Ochratoxin A During Bread Making Process. Journal of Food Safety, 37(1), e12283.

Mozaffary, P., Milani, J. M., Heshmati, A., 2019. The Influence of Yeast Level Aand Fermentation Temperature on Ochratoxin A Decrement During Bread Making. Food Science & Nutrition, 7(6), 2144-2150.

Muñoz, K., Wollin, K. M., Kalhoff, H., Degen, G. H., 2013. Zum Vorkommen Des Mykotoxins Ochratoxin A in Muttermilchproben Aus Deutschland. Das Gesundheitswesen, 75(04), 194-197.

Ng, W., Mankotia, M., Pantazopoulos, P., Neil, R. J., Scott, P. M., Lau, B. P. Y., 2009. Survey of Dry Pasta for Ochratoxin A in Canada. Journal of food protection, 72(4), 890-893.

Peng, C., Wang, L. I., An, F., Zhang, L. E., Wang, Y., Li, S., Wang, C., Liu, H., 2015. Fate of Ochratoxin A During Wheat Milling and Some Chinese Breakfast Processing. Food Control, 57, 142-146.

Piotrowska, M., Żakowska, Z., 2000. The Biodegradation of Ochratoxin A In Food Products by Lactic Acid Bacteria and Baker's Yeast. In Progress in Biotechnology (Vol. 17, pp. 307-310). Elsevier, Amsterdam.

Piotrowska, M., 2014. The Adsorption of Ochratoxin A By Lactobacillus Species. Toxins, 6(9), 2826-2839.

PubChem. Erişim Tarihi: 05/08/2022. Okratoksin A $C_{20}H_{18}ClNO_6$.. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442530

RASSF (Rapid Alert System for Food and Feed). Erişim Tarihi: 02/11/2022. https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search

RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R [Internet]. Boston, MA; 2022. Available from: http://www.rstudio.com/

Sabuncuoğlu, S. A., Baydar, T., Giray, B., Şahin, G., 2008. Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi Ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 28(1), 63-92.

Sağlam, A., Masatcıoğlu, M. T., 2020. Avrupa Birliği ve Türkiye Kaynaklı Gıdalarda 2009–2018 Yıllari Arasında RASSF Bildirimleri. Gıda, 45(4), 623-634.

Savaş Ö. A., 2016. Ekmek Yapımı Süresince Okratoksin A Yıkımı Üzerine Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 59s, Adana.

Scudamore, K. A., Banks, J., MacDonald, S. J., 2003. Fate of Ochratoxin A in the Processing of Whole Wheat Grains During Milling and Bread Production. Food Additives and Contaminants, 20(12), 1153-1163.

Shetty, P. H., Jespersen, L., 2006. Saccharomyces Cerevisiae and Lactic Acid Bacteria as Potential Mycotoxin Decontaminating Agents. Trends in Food Science & Technology, 17(2), 48-55.

Oruç, H. H., 2006. Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 24(1-2-3-4), 105-110.

Osborne, B. G., 1980. The Occurrence of Ochratoxin A in Mouldy Bread and Four. Food and Cosmetics Toxicology, 18(6), 615-617.

Osborne, B. G., Ibe, F., Brown, G. L., Petagine, F., Scudamore, K. A., Banks, J. N., Hetmanski, M. T., Leonard, C. T., 1996. The Effects of Milling and Processing on Wheat Contaminated With Ochratoxin A. Food Additives & Contaminants, 13(2), 141-153.

Osnaya, L. G., Soriano, J. M., Moltó, J. C., Mañes, J., 2007. Dietary Intake of Ochratoxin A From Conventional and Organic Bread. International Journal of Food Microbiology, 118(1), 87-91.

Öksüztepe, G., Erkan, S., 2016. Mikotoksinler ve Halk Sağlığı Açısından Önemi. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 5(2), 190-195.

Özden, S., Akdeniz, A. S., Alpertunga, B., 2012. Occurrence of Ochratoxin A in Cereal-Derived Food Products Commonly Consumed in Turkey. Food Control, 25(1), 69-74.

Özuğur, G., 2011. Ekşi Hamur Kullanımının Glutensiz Ekmeklerin Bazı Kalite Özelliklerine Etkileri. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 74s, Kayseri.

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

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

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

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

T.C. Resmi Gazete. 12 Aralık 2012. Sayı: 28502. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik

T.C. Resmi Gazete. 15 Mart 2018. Sayı: 30361. Türk Gıda Kodeksi Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği. Tebliğ No: 2018/10.

Tiryaki, O., Seçer, E., Temur, C., 2011. Yemlerde Mikotoksin Oluşumu, Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri. Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi, 21(1), 44-58.

Tola, M., Kebede, B., 2016. Occurrence, Importance and Control of mycotoxins: A Review. Cogent Food & Agriculture, 2(1), 1191103.

Topal, Ş., Aran, N., Pembeci, C., 1999. Türkiyenin Tarımsal Mikoflarasının Mikotoksin Profilleri. Gıda, 24(2), 129-137.

Topal, M. Ş., 2003. Türkiye 'nin Tarımsal Ürün ve Bölgelerine Göre Dominant Mikoflora Dağılımları ve Mikotoksin Profilleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1(12), 7-21.

Tosun, A., 2015. Çeşitli Gıdalarda Okratoksin A Varlığının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 56s, İstanbul.

Trucksess, M. W., Giler, J., Young, K., White, K. D., Page, S. W., 1999. Determination and Survey of Ochratoxin A in Wheat, Barley, and Coffee 1997. Journal of AOAC International, 82(1), 85-89.

TS ISO 21527-2, 2014. Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi - Maya ve Küflerin Sayımı İçin Yatay Yöntem - Bölüm 2: Su Aktivitesi 0,95'e Eşit veya Daha Düşük Olan Ürünlerde Koloni Sayım Tekniği. TSE, Ankara.

TS 933, 2003. Yemeklik Tuz. TSE, Ankara.

Türk Gıda Kodeksi, 2011. Bulaşanlar Yönetmeliği. 3. Mükerrer.

Türk Gıda Kodeksi, 2018/10. Gıdalardaki Mikotoksin SeviyelerininResmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği.

Ünüsan, N., 2019. Systematic Review of Mycotoxins in Food and Feeds in Turkey. Food Control, 97, 1-14.

Ürkek, B., Şengül, M., 2022. Organik Gıdalarda Problem: Mikotoksinler. ATA-Food Journal, 1(1), 1-8.

Valle-Algarra, F. M., Mateo, E. M., Medina, A., Mateo, F., Gimeno-Adelantado, J. V., Jiménez, M., 2009. Changes in Ochratoxin A and Type B Trichothecenes Contained in Wheat Flour During Dough Fermentation and Bread-Baking. Food Additives and Contaminants, 26(6), 896-906.

Van der Fels-Klerx, H.J., Kandhai, M.C., Booij, C. J. H., 2008. A Conceptual Model for Identification of Emerging Risks, Applied to Mycotoxins in Wheat-Based Supply Chains. World Mycotoxin Journal, 1(1), 13-22.

Var, I., Kabak, B., Özkarslı, M., 2004. Mikotoksin Aranmasında Kullanılan Analiz Yöntemleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2(11), 1-11.

Vega, M., Muñoz, K., Sepúlveda, C., Aranda, M., Campos, V., Villegas, R., Villarroel, O., 2009. Solid-Phase Extraction and HPLC Determination of Ochratoxin A in Cereals Products on Chilean Market. Food Control, 20(7), 631-634.

Vidal, A., Morales, H., Sanchis, V., Ramos, A. J., Marín, S., 2014a. Stability of DON and OTA During the Breadmaking Process and Determination of Process and Performance Criteria. Food Control, 40, 234-242.

Vidal, A., Marín, S., Morales, H., Ramos, A. J., Sanchis, V., 2014b. The Fate of Deoxynivalenol and Ochratoxin A During the Breadmaking Process, Effects of Sourdough Use and Bran Content. Food and Chemical Toxicology, 68, 53-60.

Westby, A., Reilly, A.,Bainbridge, Z., 1997. Fermentation on Naturally Occurring Toxins. Food Control, 8(5/6), 329.

Yılmaz, P., 2014. Trabzon Ekmeği Üretiminin Aflatoksinler Ve *Fusarium* Toksinleri Üzerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 67s, Ankara.

Yu, J., Smith, I. N., Mikiashvili, N., 2020. Reducing Ochratoxin A Content in Grape Pomace by Different Methods. Toxins, 12(7), 424.

Yentür, G., Er, B., 2012. Gıdalarda Aflatoksin Varlığının Değerlendirilmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 69(1), 41-52.

Zaied, C., Abid, S., Zorgui, L., Bouaziz, C., Chouchane, S., Jomaa, M., Bacha, H., 2009. Natural Occurrence of Ochratoxin A in Tunisian Cereals. Food Control, 20(3), 218-222.

Zinedine, A., Juan, C., Idrissi, L., Mañes, J., 2007. Occurrence of Ochratoxin A in Bread Consumed in Morocco. Microchemical journal, 87(2), 154-158.

Zinedine, A., 2010. Ochratoxin A in Moroccan Foods: Occurrence and Legislation. Toxins, 2(5), 1121-1133.