

## OKRATOKSİN A'NIN EKMEKTE BULUNMA MİKTARINDA FERMANTASYON VE PİŞİRMENİN ETKİSİ

Işıl Var<sup>1\*</sup>, Özlem Atasever Savaş<sup>1</sup>, Selin Sağlam<sup>1</sup>, Okşan Uçkun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana, Türkiye

<sup>2</sup>Adana Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Adana, Türkiye

Geliş / *Received*: 20.09.2018; Kabul/*Accepted*: 24.11.2018; Online baskı/*Published online*: 06.12.2018

Var, I., Atasever Savaş, Ö., Sağlam, S., Uçkun, O. (2018). Okratoksin a'nın ekmekte bulunma miktarında fermantasyon ve pişirmenin etkisi. *GIDA* (2018) 43 (6): 1053-1060 doi: 10.15237/gida.GD180110

Var, I., Atasever Savaş, Ö., Sağlam, S., Uçkun, O. (2018). Okratoksin a'nın ekmekte bulunma miktarında fermantasyon ve pişirmenin etkisi. *GIDA* (2018) 43 (6): 1053-1060 doi: 10.15237/gida.GD180110

### ÖZ

Okratoksin A (OTA) sıklıkla tahıllarda görülen bir mikotoksin olup, ekmek gibi tahıl ürünlerine de geçebilmektedir. Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki OTA'nın unda bulunması durumunda ekmek yapım süresince uygulanan işlemlerden sonraki değişimi incelenmiştir. Ekmek yapımı 5 µg/kg ve 10 µg/kg olmak üzere iki farklı OTA konsantrasyonu ile kontamine edilen beyaz un kullanılarak yapılmıştır. Kontamine edilen bu örneklerin OTA seviyeleri, hamur yapımı, hamur fermantasyonu ve pişirme işlemleri sonunda analiz edilmiştir. Hamur yapımı, hamur fermantasyonu ve pişirme işlemlerinden sonra 5 µg/kg konsantrasyonu için tespit edilen OTA seviyesi sırasıyla 2.76 µg/kg, 1.35 µg/kg ve 0.635 µg/kg olarak tespit edilmiş olup, 10 µg/kg konsantrasyonu için OTA seviyesi sırasıyla 7.36 µg/kg, 4.69 µg/kg ve 2.37 µg/kg olarak bulunmuştur. Çalışmamızda ekmekte tespit edilen OTA değerleri 0.38 µg/kg ile 2.915 µg/kg aralığında değişmekte olup, son üründe bulunan OTA seviyeleri Avrupa Komisyonu ve Türk Gıda Kodeksi tarafından önerilen yasal limitin (3 µg/kg) altında bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Okratoksin A, HPLC, ekmek yapımı, fermantasyon

## THE EFFECT OF FERMENTATION AND COOKING PROCESS ON THE AMOUNT OF OTA IN BREADS

### ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin can be passed to cereal products such as bread. In this study, if the OTA of different concentrations is found in flour, the change after the processes applied during the bread making process is examined. Bread-making was performed, using white flour which was spiked with two different levels of 5 µg/kg, and 10 µg/kg OTA. OTA levels were analyzed at the end of the dough making, dough fermentation, and cooking processes. For 5 µg/kg and 10 µg/kg concentration the OTA levels was found as in dough making 2.76-7.36 µg/kg, in dough fermentation 1.35-4.69 µg/kg, in baking process 0.635 -2.37 µg/kg, respectively. The OTA levels detected in the final product ranged from 0.38 µg/kg to 2.915 µg/kg. It was seen that OTA levels in final products were at concentrations below the legal limit (3 µg/kg) recommended by European Commission and Turkish Food Codex Regulation.

**Keywords:** Ochratoxin A, HPLC, baking, fermentation

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ ivar@cu.edu.tr,

☎ (+90) 322 338 60 84/2177/ 126

☎ (+90) 322 338 6614

## GİRİŞ

Tahıl taneleri (buğday, mısır, arpa, çavdar, yulaf, pirinç vb) ve bunlardan elde edilen un, irmik gibi gıdalar daha çok düşük nemli (kuru) gıda olarak kabul edilmektedir ve bu tür gıdalar uzun raf ömrüne sahip olup bozulmamaktadırlar fakat nemlenme durumlarında küflenmeler yaygın olarak görülebilmektedir. Tahıl ve tahıl bazlı ürünlerde en yaygın olarak bozulma etkeni olarak görülen küfler bu ürünleri bozmakla kalmayıp aynı zamanda oluşturdukları çeşitli toksinlerle (mikotoksinler) insan ve hayvan sağlığını etkileyebilmektedirler. Önemli mikotoksinlerden biri olarak bilinen okratoksinler, *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsi küfler tarafından üretilmektedir. Okratoksinlerin 10'u aşkın türevi bilinmektedir. Teknolojik olarak en önemlileri kimyasal yapıları bakımından birbirinden farklılık gösteren Okratoksin A (OTA), Okratoksin B (OTB) ve Okratoksin C (OTC)'dir (Çelik, 2008; Anonymus, 2006; Pohland ve ark. 1992). Tahılın OTA ile kontaminasyonu çok değişken olup, hasat esnasında ve sonrasındaki bölgesel koşullardan etkilenmektedir (Girgin vd., 2001). Özellikle %20'nin üzerindeki nem varlığında hasat edilmesi durumunda OTA özellikle tahıl ürünlerinin depolanması sırasında oluşmakta ve besin zincirine girmekte ve tahıllarda ciddi bir risk oluşturabilmektedir (Valle-Algarra vd., 2009).

Okratoksin A'nın sıklıkla tahıllarda görülen bir mikotoksin olması onlardan elde edilen unlara geçmesine neden olabilmekte ve bu unlarla yapılan başta ekmek olmak üzere tahıl ürünlerinde bulunabileceği ihtimali söz konusu olabilmektedir. Ekmek üretiminde hammadde olarak birçok girdinin kullanılması, sıcaklık, süre, ekmek boyutu gibi birçok kontrol parametresi undan ekmeğe bulaşan OTA miktarını etkilemekte, beyaz ekmek ve diğer tahıl bazlı ekmeklerde farklılıklar olabilmektedir. Ekmek yapımında kullanılan unlar farklı tahıllardan elde edilebilmektedir. Bu tahıllar içinde OTA riskinin en çok görüldüğü ve unlu mamul yapımında en çok kullanılan buğday tanesinin dış kısımları kısmen uzaklaştırıldığından buğday unundan yapılan ekmekte OTA varlığı daha düşük oranlarda tespit edilebilmektedir (Zinedine vd., 2007; Duarte vd., 2010). Bunun yanı sıra ekmek

yapım prosesinde hamur fermentasyonu ve pişirme aşamaları da başlangıç OTA seviyesindeki azalmaya neden olabilmekte ve nihai üründe tahıldan gelen OTA riski azaltılabilmektedir (Scudamore vd., 2003; Valle-Algarra vd., 2009). Fakat tüm bu işlemlere rağmen ekmekte zaman zaman limitlerin altı veya üstünde OTA ile karşılaşılabilmektedir.

Koç, 2017 yılında Adana piyasasında satılmakta olan ekmeklerle ilgili yaptığı çalışmada 46 somun ve 4 pide ekmek olmak üzere toplam 50 ekmek örneğinin 5'inde 0.13-0.98 µg/kg aralığında OTA tespit etmiştir. OTA miktarını en yüksek 0.98 ppb olarak pide ekmeğinde saptamıştır. Gölge ve Kabak 2016 yılında yaptıkları çalışmada 102 beyaz ekmek örneğinin 10'unda <2.83 µg/kg LOQ seviyelerinde OTA bulmuşlardır. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkındaki Tebliğ'e (2008/26) göre; işlenmemiş tahıllar maksimum limit 5µg/kg, işlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil) maksimum limit 3 µg/kg olarak belirlenmiştir (Anonymus, 2008). Sonuçlar limitlerin altında olsa da son ürün olan ekmekte OTA'nın tespit edilmiş olmasının önemli olduğu vurgulanmıştır.

Bu çalışma ekmek hammaddesi olarak seçilen OTA içermeyen buğday ununa farklı konsantrasyonlarda (5 ve 10 µg/kg) OTA aşılansak ekmeğe ne kadar oranda OTA geçtiğinin tartışılması amacıyla kurgulanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Piyasadan temin edilen buğday unu OTA açısından kontrol edilerek temiz olduğu görülen unlara farklı konsantrasyonlarda OTA aşılansak (5 µg/kg ve 10 µg/kg) bu OTA aşılı unlarla enzim karışımı (α-amilaz, selülaz, glukozoksidaz), pres yaş maya, tuz, su ve buz kullanılarak hazırlanan hamur, fermente hamur ve 240±5°C'de 30 dk süre boyunca pişirilmiş ekmekler çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

### Yöntem

#### Ekmek Üretimi

Çalışmamızda “Doğrudan Yoğurmanın uygulandığı Klasik Üretim” tekniği ile ekmek yapımı gerçekleştirilmiştir. Ekmek üretimi Çukurova Üniversitesi Tahıl ve Tahıl ürünleri laboratuvarında yapılmıştır. Yoğurma işlemi için ekmek yapma makinesi kullanılmış olup öncelikle tüm bileşenler (un, su, tuz, pres yaş maya, enzim karışımı) karıştırılmış ve sonrasında ortalama 15-20 dakikalık bir yoğurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yoğurma işlemi sonunda elde edilen hamur eşit parçalara bölünerek beze haline getirilmiş ve sonrasında yuvarlak şekil verilen hamurlar yaklaşık olarak 5-7 dakika süren ara dinlendirmeye alınmıştır. Ara dinlendirme sonunda yuvarlak şekilli bu hamurlara dar ve uzun şekilli olan somun ekmek şekli verildikten sonra  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de yaklaşık olarak %65-70 nemde 75 dakika boyunca fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyonu tamamlanan hamurlar  $240\pm 5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıktaki fırında 30 dakikalık süre boyunca pişirilmiştir.

#### OTA Ara Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

6 ml hacimde 1000 ng/ml konsantrasyondaki OTA standardından un, hamur ve fermente hamura aşılacak üzere 5 ve 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 'lik Okratoksin A ara stok çözeltileri hazırlanmıştır. HPLC-FLD'de kullanılacak mobil faz olarak asetonitril/su/asetik asit (48/51/1) hazırlanmış ve poliamid membran filtreden (0.2  $\mu\text{m}$ , 50 mm, Whatman GmbH, Dassel, Almanya) geçirilmiştir.

#### Una OTA Eklenmesi ve Ekmek Üretimi

Analizlerde kullanılan buğday unu piyasadan temin edilmiştir. Öncelikle kullanılan unun tespit edilebilir limitin altında toksin içerdiğinin kontrol edilmesi için örneklerde OTA analizi yapılmıştır.

Ekmek yapımında; OTA içermediği tespit edilen unlardan 50'şer gram alınarak unlar ayrı ayrı 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ve 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  düzeylerinde kontamine edilmiş ve ekmek yapımı süresi boyunca her bir aşamada başlangıçtaki OTA düzeyindeki azalmalar ölçülmüştür. Örnekler hamur yapımından, hamur fermantasyonundan ve pişirme işleminden sonra alınmış ve tüm bu aşamalardan alınan örneklerde OTA miktarı

incelenmiştir. Yapılan bu analiz sonucunda unda bulunan başlangıçtaki OTA seviyelerine göre hamurda, fermente hamurda ve ekmekte tespit edilen OTA seviyeleri karşılaştırılmıştır. Denemeler iki paralelli üç tekerrürlü gerçekleştirilmiş olup, toplamda 48 örnek analiz edilmiştir.

#### Örneklerin Ekstraksiyonu

Çalışmamızda un, hamur ve ekmek örneklerinin ekstraksiyonu için çalışılacak metot gerekli literatür araştırmalarından (Juan vd., 2008; Kabak, 2009; Bento vd., 2009; Entwisle vd., 2000) sonra bazı modifikasyonlarla AOAC Official Method 2000.03'e göre uygulanmıştır.

Analize alınan un, hamur ve ekmek örnekleri 25 g olarak tartılıp üzerine asetonitril-su karışımı eklenerek blenderda 2 dakika (dk.) yüksek devirde (22.000 rpm) karıştırılmıştır. Un ve ekmek örnekleri için 25 g örneğe 100 ml asetonitril: su (60:40) karışımı eklenerek, hamur örneklerine ise 50 ml asetonitril:su (30:20) karışımı ilave edilerek homojenizasyon gerçekleştirilmiştir. Blenderdaki karışımın homojenizasyonu sağlandıktan sonra 4 numaralı Whatman filtre kâğıdından süzölmüştür. Süzme işleminden sonra elde edilen filtratın 10 ml'si ile 40 ml PBS karıştırılmıştır. Bu karışımın 10 ml'si alınarak vakum manifold yardımı ile OTA'ya karşı spesifik antikorlar içeren immunoaffinity kolondan dakikada 1 ml hızla olacak şekilde geçirilmiştir. Daha sonra immunoaffinity kolon sırasıyla 10 ml PBS ve 10 ml ultra saf su kullanılarak yıkanmış ve kolon şırınga aracılığıyla hava ile kurutulmuştur. Spesifik antikorlara bağlı halde bulunan OTA kolondan 1.5 ml metanol ve 1.5 ml ultra saf su geçirilerek 10 ml lik viallere alınmıştır.

#### HPLC-FD ile Okratoksin A Tayini

Çalışmamızda ekstraksiyonu yapılan un, hamur, fermente hamur ve ekmek örneklerindeki OTA varlığı analizi Floresan dedektörlü HPLC (HPLC-FLD) (Agilent-1100) cihazında yapılmıştır. Bu sistemde CSI-6150 online vakum degaser (Cambridge, İngiltere), izokratik pompa (G 1310 A9, Agilent) ve otomatik enjeksiyon sistemi yer almaktadır. OTA analizi için aşağıdaki HPLC koşulları uygulanmıştır.

Kolon: C18 (250x4.6 mm, 5 µm, Advanced Chromatography Technologies, İskoçya)  
Hareketli faz: Asetonitril/su/ asetik asit (48/51/1, vol/vol/vol)  
Hareketli faz akış hızı: 1 ml/dk  
Basınç: Minimum 0 bar, maksimum 200 bar  
Analiz süresi: 15 dakika  
Altkonma zamanı: 11.2-12.4 dakika  
Enjeksiyon miktarı: 100 µl  
Excitation (uyarıcı dalga boyu): 333 nm  
Emission (yayılan dalga boyu): 443 nm  
Kolon sıcaklığı: 40°C

HPLC-FLD'de analizi yapılan örneklerin OTA konsantrasyon düzeylerini tespit etmek amacıyla değişik konsantrasyonlarda hazırlanan OTA standart çözeltileri HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. Kalibrasyonda OTA standart çözeltilerinden hazırlanmış olan 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 µg/kg olmak üzere 5 farklı konsantrasyon kullanılmıştır. HPLC kolonuna enjekte edilen OTA standartlarına karşılık gelen pik alanlarına göre cihazda bulunan yazılım "Chemstation software (Agilent) paket programı" kullanılarak 5 farklı noktadan kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ( $r^2=0.9997$ ). Un, hamur, fermente hamur ve ekmek örneklerindeki OTA varlığı hazırlanan bu kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

### Geri Kazanım, Tespit ve Ölçüm Limiti Çalışmaları

Analize alınan ve OTA açısından sorunsuz olduğu görülen un numuneleri tespit limiti ve geri kazanım çalışmaları için kullanılmıştır. Tespit limiti çalışması için OTA açısından sorunsuz olan un numunelerine OTA konsantrasyonları 5 µg/kg ve 10 µg/kg olacak şekilde toksin eklenerek geri alma çalışmaları yapılmıştır.

% Geri Kazanım aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (a / b) \times 100$$

a = Cihazda okunan OTA konsantrasyonu değeri  
b = Numuneye ilave edilen OTA konsantrasyonu  
Tespit ve ölçüm limitlerinin belirlenmesinde sinyal-gürültü oranı baz alınmış olup, sinyal/gürültü oranının 3 katı tespit limiti (LOD), 10 katı ise ölçüm limiti (LOQ) olarak çalışılmıştır.

Tespit ve ölçüm limitleri 0.25 µg/kg ve 0.75 µg/kg olarak belirlenmiştir.

OTA'nın standart eğrisinin belirtme katsayısı 0.9997 olarak bulunmuştur. Un örnekleri OTA ile iki farklı konsantrasyonda (5 µg/kg ve 10 µg/kg) kontamine edilmiştir. Ortalama geri kazanım oranları 5 µg/kg konsantrasyon için %76 iken, 10 µg/kg konsantrasyon için %93 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızda oluşturulan metot, Avrupa Komisyonu ve Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Mikotoksinlerin Seviyesinin Resmî Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliğine göre yapılmış ve elde ettiğimiz sonuçlar tebliğde yer alan OTA için yapılan kabul edilebilir geri kazanım değerleri; 1 µg/kg'den az olan konsantrasyonlar için %50-120 ve 1-10 µg/kg aralığındaki konsantrasyonlar için %70-110 olarak belirlenen değerlere uygun bulunmuştur.

### Ekmek Yapım Aşamalarında OTA Miktarındaki Değişimler

Ekmek yapımında kullanılan 50'şer gram un ayrı ayrı 5 µg/kg ve 10 µg/kg düzeylerinde OTA ile kontamine edilmiştir. Ekmek yapım süreci boyunca; elde edilen hamurdan, fermente hamurdan ve pişirilmiş ekmekten örnekler alınarak OTA miktarı incelenmiştir. Yapılan bu analiz sonucunda una aşılansız 5 µg/kg ve 10 µg/kg OTA seviyelerindeki azalma hamurda, fermente hamurda ve ekmekte ölçülen OTA seviyeleri ile karşılaştırılmıştır.

Denemeden elde edilen sonuçlar Çizelge 1'de gösterilmiştir. Çizelge 1'de görüleceği üzere, unun 5 µg/kg'lik OTA ile kontamine edilmesi durumunda hamur yapımı sonunda OTA miktarı 2.76 µg/kg ve hamur fermentasyonu sonunda 1.35 µg/kg iken; pişirme sonunda OTA miktarı 0.635 µg/kg olarak tespit edilmiştir.

Unun 10 µg/kg ile kontamine edilmesi ile gerçekleştirilen ekmek yapımında hamurda OTA miktarı 7.36 µg/kg ve hamur fermentasyonu sonunda fermente hamurda OTA miktarı 4.69 µg/kg iken; pişirme sonunda OTA miktarı 2.37 µg/kg olarak tespit edilmiştir.

## Ekmek prosesinde okratoksin A varlığının incelenmesi

Çizelge 1. OTA ile kontamine edilmiş unla yapılan çalışma sonuçları  
Table 1. Results of work with flour contaminated with OTA

Örnekler Examples	OTA konsantrasyonu OTA concentration (mean $\pm$ SD*, $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	OTA konsantrasyonu OTA concentration (mean $\pm$ SD*, $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
UN flour	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (başlangıç) 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (started)	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (başlangıç) 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (started)
Hamur dough	2.76 $\pm$ 0.36 <sup>Aa**</sup>	7.36 $\pm$ 0.33 <sup>Ba</sup>
Fermente Hamur fermented dough	1.35 $\pm$ 0.11 <sup>Ab</sup>	4.69 $\pm$ 0.20 <sup>Bb</sup>
Ekmek bread	0.63 $\pm$ 0.07 <sup>Ac</sup>	2.37 $\pm$ 0.22 <sup>Bc</sup>

\*SD, Standart sapma

\*SD, Standard deviation

\*\*Çizelgede farklı harfle gösterilen değerler arasındaki farklar 0.05 güven sınırına göre önemlidir.

\*\*Differences between the values shown in the table with different letters are important according to 0.05 confidence limits.

NOT: Satırlar kendi içinde incelendiklerinde farklı büyük harfi taşıyanlar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre fark vardır. Sütunlar kendi içinde incelendiklerinde farklı küçük harfi taşıyanlar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre fark vardır.

NOTE: There are differences between the Duncan multiple comparison test between the different capital letters when the lines are examined in themselves. When the columns are examined in themselves, there is a difference according to the Duncan multiple comparison test among the different lower case

Çizelge 1'e göre iki farklı konsantrasyon (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ve 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ayrı ayrı incelendiğinde, hamur yapımı, hamur fermantasyonu ve pişirme aşamaları sonunda elde edilen OTA konsantrasyonları (OTA konsantrasyon miktarına göre) farklı büyük harfi taşıyan (A, B) işlem basamakları arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre farkın önemli olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ). Çalışmamızda kullanılan iki farklı konsantrasyon için (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ve 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) hamur yapımı, hamur fermantasyonu ve pişirme aşamaları kendi aralarında incelendiğinde (örnekler arası) farklı küçük harfleri taşıyan (a, b, c) OTA konsantrasyonları arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre fark görülmüştür ( $p<0.05$ ).

Satırların kendi içinde incelenmesi sonucunda görülen farklılık unda bulunan başlangıç OTA seviyesi ile ilişkili olup, unda bulunan OTA seviyesi ne kadar az oranda ise ekmek yapım aşamaları sonunda bu oran daha düşük seviyelere indirgenebilmektedir. Hamur, fermente hamur ve

ekmek örneklerinde tespit edilen edilen OTA seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmaktadır. OTA seviyesindeki azalma olarak görülen bu farklılık hamur yapımında kontamine edilmiş una diğer bileşenlerin (özellikle su) ilavesi ile oluşan seyrelmeden kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra, hamur fermantasyonu sonunda OTA seviyesi başlangıç seviyeye göre daha da azalmıştır. Bu aşamada, belirli bir sıcaklık ve süre normunda (30  $\pm$ 1°C, 75 dk) fermantasyonun gerçekleştirilmesi için kullanılan *S.cerevisiae* mayasının etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalar mayanın belli bir yüzde de olsa toksini bağlayıcı ve degrade edici özelliği olabileceğinden söz etmektedir. Var ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada 10<sup>8</sup> CFU/mL mayaların 10 ng OTA içeren beyaz şarapta maksimum % 21.40 azalttığını bildirmişlerdir. Böhm ve arkadaşları (2000) tarafından, *Saccharomyces cerevisiae*'nin OTA'yı degrade edebilme özelliği üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise 0.05 mg OTA/L'nin ancak %38'ini degrade edilebildiğini ve degradasyon

metabolitlerinin ise bu aşamada neler olabileceğinin henüz araştırılmadığını bildirmişlerdir. Yine bazı araştırmacılar (Valle-Algarra vd., 2009; Scudamore vd., 2003; Cecchini, 2006; Armando vd., 2013) hamur fermantasyonunda görülen bu OTA düzeyindeki azalmanın kullanılan *S.cerevisiae* mayasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Pişirme ile ( $240 \pm 5^\circ\text{C}/30$  dk) bu konsantrasyon daha da azalmış ve yasal limitlerin altına düşmüştür. OTA erime noktası  $169^\circ\text{C}$  olduğundan kullanılan pişirme sıcaklığında her ne kadar ekmek içindeki sıcaklık pişirme sıcaklığının altında kalmaktaysa da fırın içi sıcaklığından dolayı OTA'nın zarar görebileceği düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada da sonuçta OTA azalmasının en çok pişirme sürecinde olduğu görülmektedir. Her iki OTA konsantrasyondaki bu azalışa baktığımızda ekmekte tespit edilen OTA miktarının yasal limitlerin altında kalmasını sağladığı görülmüştür.

Una ilave edilen  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  konsantrasyonundaki OTA ile yapılan çalışmada ekmek yapım süresince görülen OTA düzeyindeki azalma oranı hamur yapımı sonunda %44.8, hamur fermantasyonu sonunda %51.08 ve pişirme sonrasında %53.3 olarak görülmüştür.

Una  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  konsantrasyonunda OTA aşılması ile yapılan çalışmada ise; OTA miktarındaki azalma oranı ortalama olarak hamur yapımı sonunda %35.86 ve hamur fermantasyonu sonunda %36.27 iken pişirme sonunda bu oran %49.46 olarak tespit edilmiştir.

Una OTA aşılması yapılarak ekmek yapım sürecinin OTA üzerindeki etkisini inceleyen Valle-Algarra ve ark. (2009),  $29-30^\circ\text{C}$ 'de bir saat boyunca yapılan hamur fermantasyonunda OTA seviyesindeki azalmanın %29.5 ve %33.5 aralığında gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda hamur fermantasyonundan sonra, ekmek hamuruna  $240^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika boyunca pişirme işlemi uygulanmıştır. Pişirme işlemi sonunda elde edilen OTA düzeyindeki azalma oranı  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  ve  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  konsantrasyonları için

sırasıyla %53.3 ve %49.46 olarak tespit edilmiştir. Una OTA aşılması yapılarak ekmek yapım sürecinin OTA üzerindeki etkisini inceleyen Valle-Algarra ve ark., (2009) tarafından yapılan çalışmada ise farklı OTA konsantrasyonları ( $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) üzerine fermantasyondan sonra farklı sıcaklık ve süre kombinasyonlarında ( $190^\circ\text{C}/50$  dk,  $207^\circ\text{C}/40$  dk,  $223^\circ\text{C}/35$  dk,  $240^\circ\text{C}/30$  dk) pişirme işlemi uygulanmış ve pişirme sonunda OTA'nın ortalama azalma oranı %32.9 olarak tespit edilmiştir. Farklı sıcaklık ve süre kombinasyonlarının OTA üzerindeki etkisinin incelendiği bu çalışmada en iyi azalma oranının  $223^\circ\text{C}/35$  dk pişirme koşullarında gerçekleştiği bildirilmiş olup, bu OTA düzeyindeki azalma oranının %25 ile %45 aralığında olduğu tespit edilmiştir.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Ekmek yapım aşamalarının OTA seviyesi üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmamızda OTA yıkımı üzerine en belirgin azalma oranı fermantasyon ve pişirme aşamalarında görülürken, pişirme işleminin OTA yıkımı üzerindeki etkisi daha yüksek oranda bulunmuştur. Ekmek yapım süreci sonunda elde edilen son ürünlerdeki OTA değerlerinin Avrupa Birliği ülkelerinde ve Türk Gıda Kodeksi'nde kabul edilebilir maksimum OTA miktarının  $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  olduğu göz önüne alındığında yasal limitlerin altında olduğu görülmektedir. Ancak ekmek hammaddesi olan unda OTA miktarı arttıkça son ürün olan ekmekte toksinin kalma oranı o oranda arttığı yapılan bu çalışmada da gösterilmiştir (Bkz Çizelge1).

Ülkemizin farklı bölgelerinde tahıl ve tahıl unlarında OTA düzeylerinin araştırıldığı çalışmalara baktığımızda (Karagözlü ve Karapınar, 2000; Baydar vd., 2005; Özturan vd., 2007) Türkiye'de ve Avrupa birliğinin tahıl ve türevlerinde OTA için tolere edilebilir maksimum değerlerden ( $3 \text{ ng}/\text{g}$ ) yüksek olması durumunda ya da bu gıdalardaki OTA seviyesinin yasal limitlerin altında olması durumunda tüketimin fazla olması nedeniyle sağlık açısından risk oluşturabilmektedir. Kabak (2009)'da Adana'da yaptığı bir çalışmada çeşitli tahıl ürünlerinde OTA'ya

rastladığını ve tespit edilen değerlerin Avrupa birliğinin tahıl ve türevlerinde OTA için tolere edilebilir maksimum değerlerinden (3 ng/g) düşük bulunmasına rağmen tahıl ve türevlerinin tüketim oranının yüksek olması nedeniyle sağlık yönünden risk oluşturulabileceğinin önemini vurgulamıştır. Avrupa'nın diğer ülkelerine kıyasla Türkiye'de fazla tüketilen tahıl ürünlerinin çeşitliliği de göz önüne alındığında, tahılların OTA seviyesindeki minimum artışlarda bile büyük sağlık sorunlarına neden olabileceği bildirilmiştir.

Bu nedenle bu ürünlere OTA üreten küflerin bulaşmasını engellemek ve OTA sorunu yaşamamak için üniversiteler, tahıl yetiştiricileri, unlu mamul sanayi ve diğer ilgili kurumlar işbirliği yapmalı, alınması gereken önlemler ve uygulama olanakları araştırılmalı, iyi tarım uygulamaları (GAP) ve HACCP uygulamaları entegre şekilde kullanılmalıdır. Ayrıca ülkemizde tahıl ve tahıl ürünlerinin OTA ve diğer mikotoksinler açısından risk oluşturup oluşturmadığı tarlada, depolarda ve nihai ürünlerde araştırılmalı ve elde edilen bulgular ile tarım ve sanayi açısından sorun çözülmeye çalışılmalıdır.

### TEŞEKKÜR

Bölümümüzde yürütülen "Ekmek yapım aşamasında fermantasyon ve pişirmenin okratoksin A üzerine etkisinin incelenmesi" projesi kapsamında oluşturulan bu çalışmanın gerçekleşmesindeki desteklerinden dolayı Çukurova Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

Anonymus, 2006. Ochratoxin A in Food, May 2006. Centre for Food Safety Food and Environmental Hygiene Department. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region. <http://www.cfs.gov.hk> (Erişim Tarihi: 10.02.2013).

Anonymus, 2007. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Mikotoksinlerin Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 26.04.2007 tarih ve 26504 sayılı resmi gazete.

Anonymus, 2008. TGK Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ. 17.05.2008-26879.

AOAC, 2000. Ochratoxin A in Barley Immunoaffinity By Column. *J AOAC Int.*, 83, s.1377.

Armando MR, Dogi CA, Poloni V, Rosa CAR, Dalcero AM, Cavaglieri LR. 2013. Invitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *Int J Food Microbiol*, 161,s.182–188.

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

Bento JMV, Pena A, Lino CM, Pereira J. 2009. Determination of Ochratoxin A Content in Wheat Bread Samples Collected From Alvarge and Bragança Regions, Portugal: Winter 2007. *Microchem J*, 91, s.165-169.

Böhm J, Grajewski J, Asperger H, Cecon B, Rabus B, Razzazi E. 2000. Study on Biodegradation of Some A- and B-Trichothecenes and Ochratoxin A by Use of Probiotic Microorganisms. *Mycotoxin Res*, 16(1), s.70-74.

Cecchini, F, Morassut M, Garcia-Moruno E, Di Stefano R. 2006. Influence of yeaststrain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiol*, 23, s.411–417.

Çelik, C. 2008. Adana'da bazı marketlerde satışı sunulan çekirdeksiz kuru üzümde okratoksin A varlığının HPLC yöntemi ile araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye, 55 s.

Duarte SC, Pena A, Lino CM. 2010. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiol*, 27, s. 187-198.

EC (European Commission), 2002. Commission Directive 2002/26/EC of 13 March 2002 Laying down the sampling methods and the methods of

- analysis for the official Control of the levels OTA in foodstuffs. *Off J the Eur Communities*, L75, s.38-43.
- Entwisle AC, Williams AC, Mann PJ, Slack PT, Gilbert J. 2000. Liquid Chromatographic Method with Immunoaffinity Column clean-up for Determination of Ochratoxin A in Barley: collaborative study. *J AOAC Int*, 83,s.1377-1383.
- Girgin G, Başaran N, Şahin G. 2001. Dünyada ve Türkiye’de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler. Derleme. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 58(3), 97-118.
- Gölge, Ö., Kabak, B., 2016. First report: Exposure estimates to ochratoxin A through wheat bread and rice intake in Turkey. *J Cereal Sci*, 69, 213-217.
- Juan C, Pena A, Lino CM, Molto JN, Manes J. 2008. Levels of Ochratoxin A in Wheat and Maize Bread from the Central Zone of Portugal, *Intl J Food Microbiol*, 127, s.284-289.
- Kabak, B., 2009. Ochratoxin A in Cereal-derived products in Turkey. Occurrence and Exposure assessment. *Food Chem Toxicol*, 47, 348-352.
- Karagözü N, Karapınar M. 2000. Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Okratoksin A ve Fungal Kontaminasyon. *Türk J Biol*, 24, s. 561-572.
- Koç, N.F., 2017. Adanada fırın ve marketlerde satışa sunulan ekmeklerde okratoksin A varlığının HPLC yöntemi ile araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana. 60 s.
- Özturan K, Ünsal C, Karakaya Y, Atasever M, Ceylan ZG, Aydemir Atasever M, Demirkaya AK. 2007. Erzurum’da tüketime sunulan buğday unlarının toplam aflatoksin, aflatoksin B1 ve okratoksin A yönünden incelenmesi. Ankara Üniversitesi, *Vet. Bil. Derg.*, 2(4): 172-176.
- Pohland AE, Nesheim S, Friedman L. 1992. Ochratoxin A, a review. *Pure Appl Chem*, 64, s.1029-1046.
- Scudamore KA, Banks J, Macdonald SJ. 2003. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Addit Contam*, 20 (12), s.1153–1163.
- Valle-Algarra FM, Mateo EM, Medin, A, Mateo AF, Gimeno Adelantado JV, Jiménez M. 2009. Changes in ochratoxin A and type B Trichothecenes contained in wheat flour during dough fermentation and bread-baking. *Food Addit Contam*, 26, s.896-906.
- Var, I., Erginkaya, Z., Kabak, B. Reduction of Ochratoxin A levels in white wine by Yeast Treatments. *J Inst Brew*, Vol:115. Issue:1, 30-34 (2009).
- Zinedine A, Juan C, Idrisi L, Manes J. 2007. Occurrence of ochratoxin a in bread consumed in Morocco. *Microchem J*, 87, s.154-158.