

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRK KAHVESİ ÖRNEKLERİNDE OKRATOKSİN A VARLIĞI**

**Ruşen METİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Doç. Dr. Muhammet ARICI**

**Tekirdağ, 2006**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**ÖZET**

**TÜRK KAHVESİ ÖRNEKLERİNDE OKRATOKSİN A VARLIĞI**

Bu araştırmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden tesadüf örnekleme yöntemine göre 44 adet öğütülmüş ve kavrulmuş kahve numuneleri toplanarak Okratoksin A miktarı ve *E.coli*, toplam koliform, küf –maya, toplam mezofil canlı düzeyleri ve nem oranları belirlenmiştir. Okratoksin A analizi Elisa yöntemiyle yapılmıştır.

Araştırma sonucunda 1 adet örnekte Okratoksin A tespit edilemezken, 9 adedin okratoksin A düzeyi 2 ppb'nin üzerinde bulunmuştur. Örneklerin okratoksin A miktarları 0-2,6 ppb arasında değişim göstermiştir. 21 (%47,73) adet örnekte koliform bakteri belirlenmemişken 23 (%52,27) adet numunenin koliform bakteri düzeyleri Türk Gıda Kodeksi'nin tavsiye ettiği miktarın üzerinde tespit edilmiştir. Örneklerin toplam mezofil canlı bakteri yükü 0-10<sup>6</sup> kob/g arasında değişkenlik göstermiş, 7 adet örnekte toplam mezofil canlı bakteri belirlenememiştir. Yapılan küf analizlerinde 16 adet örnekte küf belirlenmiştir.

44 adet örneğin nem oranları %1,04-%5,87 arasında değişkenlik göstermiştir. 30 (%68,18) adet örneğin nem düzeyleri TSE Standartları'nda belirlenen limitlerin (%3) üzerinde bulunmuştur.

Tez Yılı: 2006

Sayfa Sayısı: 38

Anahtar kelimeler: Türk Kahvesi, Okratoksin A, Küf, Nem.

**TRAKYA UNIVERSITY**  
**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING**  
**MASTER THESIS**  
**SUMMARY**

**THE PRESENCE OF OCHRATOXIN A IN TURKISH COFFEE SAMPLES**

In this research, 44 samples of Turkish coffee randomly collected from different regions of Turkey were analysed for *E.coli*, total coliform bacteria, mold, total bacteria moisture, and ochratoxin A. Elisa method was used to analyse ochratoxin A.

In research results; while ochratoxin A was not detected in 1 sample, ochratoxin A level of 9 samples were determined over 2 ppb. The amount of ochratoxin A in all samples were determined between 0 and 2.6. In 21 (% 47.73) of all samples, no coliform bacteria was detected. Coliform bacteria levels of 23 (%52.27) samples were above recommended levels of Turkish Food Codex. Total bacteria counts of all samples ranged from 0 to 10<sup>6</sup> cfu/g. It was not determined any total bacteria in 7 samples. Mold was determined in 16 samples.

Moisture levels of 44 samples ranged from %1.04 to %5.87. Moisture levels of 30 samples (%6818) were above determined levels (%3) of Turkish Standards Institution.

Date of Thesis: 2006

Number of Pages: 38

Key words: Turkish coffee, Ochratoxin A, Mold, Moisture.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR BİLGİSİ</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Okratoksinlerin Yapısı ve Özellikleri</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Okratoksin A'nın Sağlık Üzerine Etkisi</b>	<b>8</b>
<b>2.3. Okratoksin Üreten Küfler Ve Gelişme Şartları</b>	<b>10</b>
<b>2.4. Kahvede OTA Üreten Küflerin Varlığı ve OTA Üretimi</b>	<b>12</b>
<b>2.5. Kavurma İşleminin OTA'ya Etkisi</b>	<b>16</b>
<b>2.6. Kahve bileşenlerinin OTA üretimi üzerine etkileri</b>	<b>17</b>
<b>2.7. Kahvede OTA miktarını belirleyen yasal düzenlemeler</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERYAL VE METOT</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Materyal</b>	<b>20</b>
<b>3.2. Metot</b>	<b>21</b>
<b>3.2.1. Okratoksin A Analizi (Elisa Metodu)</b>	<b>21</b>
<b>3.2.2. Mikrobiyolojik analizler</b>	<b>21</b>

<b>3.2.2.1. Toplam koliform sayımı</b>	<b>21</b>
<b>3.2.2.2. Toplam mezofil canlı bakteri sayımı</b>	<b>22</b>
<b>3.2.2.3. Küf sayımı</b>	<b>22</b>
<b>3.2.3. Rutubet miktarının belirlenmesi</b>	<b>22</b>
<b>3.2.4. İstatistiksel Analizler</b>	<b>23</b>
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Kahve Örneklerinde Okratoksin A (OTA) Miktarı</b>	<b>24</b>
<b>4.2. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları</b>	<b>26</b>
<b>4.2.1. Kahve örneklerinde koliform bakterilerin varlığı</b>	<b>26</b>
<b>4.2.2. Kahve örneklerinin toplam mezofil canlı bakteri sayıları</b>	<b>29</b>
<b>4.2.3. Kahve örneklerinin küf sayıları</b>	<b>32</b>
<b>4.3. Kahve örneklerinin % nem miktarı</b>	<b>35</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>37</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>39</b>

<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
ÇİZELGE 2.1 Kahvede OTA İçin Ulusal Düzeyde Belirlenen Maksimum Limitler	19
ÇİZELGE 4. 1. Kahve Örneklerinde Bulunan OTA Miktarları	24
ÇİZELGE 4.2 Kahve Örneklerinin OTA Düzeylerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	26
ÇİZELGE 4.3 Kahve Örneklerinin Toplam Koliiform Bakteri Miktarları	27
ÇİZELGE 4.4 Kahve Örneklerinin Toplam Koliiform Bakteri Düzeylerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	28
ÇİZELGE 4.5 Kahve Örneklerinin Toplam Mezofil Canlı Bakteri Miktarları	30
ÇİZELGE 4.6 Kahve Örneklerinin Toplam Mezofil Canlı Bakteri Düzeylerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	31
ÇİZELGE 4.7 Kahve Örneklerinin Küf Miktarları	33
ÇİZELGE 4.8 Kahve Örneklerinin Küf Düzeylerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	34
ÇİZELGE 4.9 Kahve Örneklerinde Bulunan % Nem Oranları	35
ÇİZELGE 4.10 Kahve Örneklerinin Nem Oranlarına Ait Varyans Analiz Sonuçları	36

<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
ŞEKİL 2.1 Okratoksin A'nın kimyasal yapısı ve ilgili metabolitleri	7
ŞEKİL 4.1 OTA Konsantrasyonlarına Göre Kahve Örneklerinin Dağılımı	25
ŞEKİL 4.2 Koliform Bakteri Miktarlarına Göre Kahve Örneklerinin Dağılımı	28
ŞEKİL 4.3 Toplam Mezofil Canlı Bakteri Miktarlarına Göre Kahve Örneklerinin Dağılımı	31
ŞEKİL 4.4 Küf Miktarlarına Göre Kahve Örneklerinin Dağılımı	34
ŞEKİL 4.2 % Nem Miktarlarına Göre Kahve Örneklerinin Dağılımı	36

## 1. GİRİŞ

Gelişmiş ülkelerde, son günlerin en yaygın problemi, gıda kalitesi ve güvenliğidir. Mikotoksin oluşumu ve bununla ilgili olarak insanlarda ve hayvanlarda toksik etkilerin oluşumu, gıda güvenliğinin başlıca kısmını oluşturur. Araştırmalar, her yıl dünya gıda ürünlerinin yaklaşık %25'inin belli miktarda mikotoksin ile etkilendiğini belirtmektedir. Bu durum, önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Anon., 2004).

Geçmişte gıda ve yemlerde üreyen küflerin bu ürünlerin sadece fiziksel görünüşünde bir değişiklik yaptıkları kabul edilerek, gıda ve yemdeki küflü kısımlar atılır, kalan az küflenmiş kısımların insanlar, ileri derecede küflenmiş kısımların ise hayvanlar tarafından tüketilmesinin sağlığa zararlı olmayacağı kabul edilirdi. 1960 yılında İngiltere'de sebebi bilinmeyen bir hastalıktan yüz bin hindinin ölmesi sonucu yapılan araştırmalarda, aflatoksin izole edilmiş, bundan sonra küfler ve toksinleri üzerinde çok sayıda araştırmalar yapılmıştır (Garip, 2000).

Mikotoksin terimi, yunanca küf anlamına gelen “mykes” ve Latince zehir anlamına gelen “toxicum” kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur (Anon., 2006a). Mikotoksinler küflerin salgıladığı, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan, antijenik özellik göstermeyen sekonder metabolik ürünlerdir (Ünlütürk ve Turantaş, 1999). Mikotoksikozis ise, mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yemlerin tüketilmesiyle ortaya çıkan hastalıklardır.

Mikotoksinler, çeşitli bitkisel ve hayvansal orijinli gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır ve bitkisel ürünlerde hasat öncesinde olduğu gibi hasat sonrasında da oluşabilmektedir ve insan sağlığını tehdit edici özelliكتedir (Karagözlü ve Karapınar, 1998). İnsanlarda mikotoksinin sebep olduğu hastalık akut toksisite, kronik toksisite ya da karsinojenitedir. Bazı mikotoksinler, karaciğer ve böbreklerin ciddi iltihaplanmasına, yoğun kanamalara ve bazen de ağız ve sindirim sisteminde ülsera sebep olmaktadır (Kap Pazarbaşı, 2002; Creppy, 2002). İlk mikotoksikozis vakası ortaçağ sonrası Avrupa'da

görülen *Claviceps purpurea* küfünün oluşturduğu ergot toksininin neden olduğu ergotizm zehirlenmesidir. Tarihte görülen diğer önemli mikotoksikozis vakası ise İkinci Dünya Savaşı sırasında Rusya'da küflenmiş tahıl ürünlerinin yenmesiyle görülen Alimentary Toxik Aleukia (ATA) hastalığı birçok deri lezyonlarına, kanama ve lökopenia (kandaki lökosit sayısının anormal düzeyde düşmesi) ve kemik iliği dejenerasyonuna sebep olmuştur. Bu hastalık nedeniyle ölüm oranı %60'lara kadar çıkmış ve hastalık bazı bölgelerde populasyonun %10'unu etkilemiştir (Kiremit, 1993). Mikotoksinlerin en az 14 tanesinin karsinojenik etkisi saptanmış olup, bir çoğu akut veya kronik çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1999). Günümüzde yaklaşık 300 civarında farklı mikotoksinin varlığı bilinmektedir ve bu mikotoksinlerin çoğu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* ve *Rhizopus* gibi küf cinslerince sentezlenmektedir (Karagözlü ve Karapınar, 1998).

*Aspergillus* küflerinin ürettiği toksinler arasında aflatoksin, okratoksin, sterigmatosistin, aspergillik asit, kojik asit, tremorjenik toksin, oksalit asit sayılabilir. Aflatoksin ilk defa 1960 yılında bir tavuk çiftliğinde 100.000'den fazla hindinin ölümüne yol açan bir hastalık sonucu ortaya çıkmıştır. Hastalığa hayvan yemlerine katılan yer fıstığı unlarındaki küflerin neden olduğu saptanmış, yapılan araştırmalarda bu küfün *Aspergillus flavus* olduğu belirlenmiştir ve ürettiği toksin de aflatoksin olarak isimlendirilmiştir. Son bulgulara göre *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* aflatoksin üreten küflerdir. Aflatoksinlerin en sık izole edildiği gıdalar yer fıstığı, mısır, çığit olmasının yanında yağlı tohumlar, hububat ürünleri, kuru meyveler, kırmızı biber ve patatesten de izole edilmiştir (Ünlütürk ve Turantaş, 1999). Aflatoksinlerin yakın formları olmakla beraber en önemlileri aflatoksin B1, B2, G1, G2, M1 ve M2'dir. *Aspergillus flavus* B grubu aflatoksinleri üretme kabiliyetine sahipken *Aspergillus parasiticus* tüm aflatoksin çeşitlerini üretme yeteneğine sahiptir (Creppy, 2002; Tarin ve ark., 2004).

*Penicillium* küflerinin ürettiği toksinlerin en önemlileri rubratoksin, patulin, penisillik asittir. Bunların yanında *Penicillium* küflerinin ürettiği toksinler arasında luteosikirin, sikloklorotin, izlanditoksin, eritrosikirin, rugolosin, mikofenolik asit,

dekumbin, B-nitropropanik asit, siklopiazonik asit, griseofulvin, viridisatin, siklopenin, viridikatik asit sayılabilir (Ünlütürk ve Turantaş, 1999).

Mikotoksinler gıdalarda gramda, nanogramdan mikrogram ölçülerine kadar farklı aralıklarda bulunurlar. Fakat sadece bunlardan yaklaşık 20 tanesi gıdalarda ve yemlerde önem oluşturacak konsantrasyonlarda bulunurlar. Bunların kontrol altına alınması yalnızca tüketicilerin korunması açısından değil, çiğ ürünleri nakleden veya işleyen üreticiler için de önem taşımaktadır. Mikotoksinlerin oluşumunu etkileyen faktörler içinde en önemlileri; küf cinsi, ortamdaki gazların konsantrasyonları, bağıl nem, substrat çeşidi, inkübasyon sıcaklığı ve süresidir (Cabrera ve ark., 2004; Höhler, 1998).

Belirli sınır üzerindeki mikotoksin içeren ürünlerin ithalatını engellemek için bir çok ülke, gıdalarda izin verilebilir maksimum mikotoksin miktarlarını belirlemişlerdir. 70'ten fazla ülke, mikotoksin girişini engellemek için sınırlandırmalara gitmiştir. Fakat bu sınırlandırmalar da ülkeden ülkeye değişiklik göstermekle beraber mikotoksin çeşidine ve gıda matriksine göre de değişiklik gösterir (Gilbert ve Anklam, 2002).

Türkiye'de mikotoksin sorunu 1967'de Kanada'ya ihraç edilen fındıkların aflatoksin içermeleri nedeniyle gündeme gelmiştir. Yine 1971'de Amerika'ya ihraç edilen Antepfıstıklarının ve 1972'de Danimarka'ya gönderilen kuru incirler aflatoksin içermeleri sebebiyle geri gönderilmişlerdir (Kiremit, 1993). Türkiye'de gıda olarak tüketilen bitkisel ürünlerdeki mikotoksin kalıntılarıyla ilgili çalışmalar Antepfıstığında ve kuru incirlerde aflatoksin ve aflatoksijenik küflerin saptanmasıyla hız kazanmakla beraber genelde aflatoksinlerle sınırlı kalmış, okratoksinlerle ilgili araştırmalar 1990'lı yıllarda başlamıştır. Ancak bu çalışmaların sayısı da Türkiye'deki okratoksin A (OTA) problemini açıkça ortaya koyacak kadar çok değildir ve yapılan bu çalışmalar da genelde daha önceki çalışmalarla aflatoksin içeriği açısından dikkatleri üzerine çeken gıda maddelerinde yoğunlaşmıştır (Karagözlü ve Karapınar, 1998). Kahvenin küf içeriği ve küflerin kahvede OTA üretebilme kabiliyetlerinin araştırıldığı çalışmalar da çok sınırlıdır.

Kahve, hoş tadı, farmakolojik etkileri, zihni uyarıcı etkilerinden dolayı dünyada en çok tüketilen içeceklerden birisidir (Soliman, 2002). Tüketime hazır hale gelinceye kadar kahve, başlıca beş aşamadan geçmektedir: Kahve çekideklerinin olgunlaşması, toplanması, sulu veya kurutma yöntemiyle kabuklarından ayrılması, kavrulması ve öğütülmesi (Viani, 2002).

Kahve, *Rubiacea* familyasına ait bir bitkidir ve cinsi *coffea*'dır. Ticari olarak iki önemli türü vardır. Bunlar, *Coffea arabica* Linn ve *Coffea conefera* Pierre ex Frochner'dir. Geleneksel isimlendirmede bu iki tür *Coffea arabica* ve *Coffea robusta* olarak bilinmektedir (Çağlarımak, 1994). Kahve ağacı; bol yağış alan, ortalama sıcaklığın 18-24°C arasında olduğu ve don olayının görülmediği, ekvatorun 25 Kuzeyi – 30 Güneyi arasındaki kuşakta yetişir (Anon., 2006a). Bu bölgedeki sıcaklık ve nem şartları küflerin gelişimi için oldukça uygundur.

Kahvede görülen en önemli mikotoksin türü okratoksinlerdir. Okratoksinler, *Aspergillus* ve *Penicillium* toksijenik küflerin ikincil fungal metabolitleridir. Bunlardan en yaygın olanı OTA'dır. Gıda ve yemlerde OTA yaygın olarak bulunur (Höhler, 1998). Okratoksin A ve daha az toksijenik olan Okratoksin B ilk kez 1965 yılında Güney Afrikalı kimyacılar tarafından tanımlanmıştır ve D.B. Scott tarafından sorgum tanelerinden izole edilen *Aspergillus ochraceus* K-804 suşundan izole edilmiştir. Bunu takip eden çalışmalarda arpa, buğday, pirinç, yulaf, soya fasulyesi, kahve çekirdekleri, kırmızı biber gibi bitkisel ürünlerde, buna bağlı olarak un, kahve, ekmek, bira gibi bitkisel orijinli gıdalarda, hayvan yemlerinde ve yem hammaddelerinde tespit edilmiştir (Garip, 2000).

Okratoksin A üretimi, kahvenin hasat sonrası işlemlerinde, depolanması ve taşınması sırasında olur. Okratoksin A üretimini belirleyen faktörlerin bilinmesi toksin bulaşımını azaltmada ve işlem aşamalarında toksin oluşumunu kontrol altına alınmasında yardımcı olur. Bu çalışmada kavrulmuş ve öğütülmüş Türk kahvesinde OTA düzeyleri saptanarak Türkiye'de kahvenin durumunun ortaya konması amaçlanmıştır. Türkiye'de fazla miktarda kahve tüketiminin olması bu çalışmalara önem kazandırmaktadır. Ayrıca kahvelerin toplam bakteri, koliform, *E.coli*, küf ve maya düzeyleri incelenerek kahvenin mikrobiyolojik yükü ve nem düzeyleri araştırılmıştır.

## 2.LİTERATÜR BİLGİSİ

### 2.1. Okratoksinlerin Yapısı ve Özellikleri

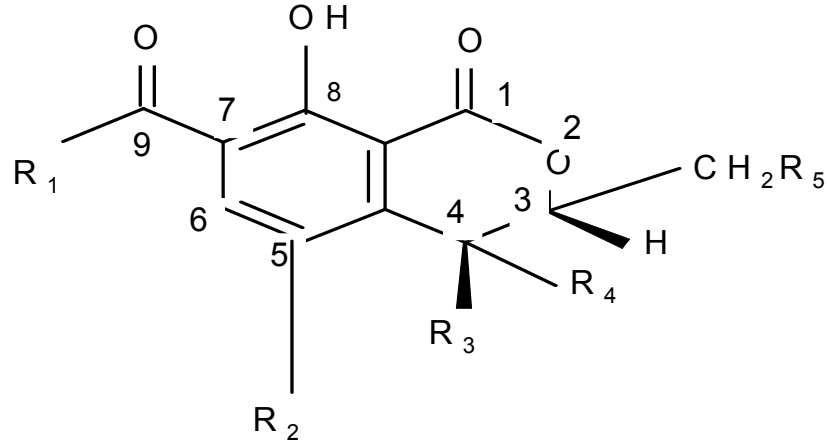
Okratoksinin moleküler formülü ilk kez 1965 yılında van der Merwe ve arkadaşları tarafından *Aspergillus ochraceus* suşunun bir metaboliti olarak bulunmuş (Şekil 1), moleküler formülü 7-karboksi – 5 kloro – 8 hidroksi -3,4- dihidro – 3 – metilisokumarin olarak açıklanmıştır. Bu molekül, dihidroisokumarinik halkaya 7-karboksil grubundan amid bağı vasıtasıyla 1- fenilalanin bağlanarak oluşmuştur (Kiremit, 1993; Varga ve ark., 2000).

Gıdalarda ve yemlerde yaygın olarak bulunan ve zehirlenmeye neden olan okratoksin türü OTA'dır. Okratoksin B ise doğada nadir olarak bulunurken Okratoksin C'ye rastlanmamıştır. Okratoksin B'nin zehirliliği daha düşük olup okratoksin C'nin zehirliliği OTA'ya yakındır. Okratoksin A vücutta değişime uğradıktan sonra idrar ve dışkıyla atılan şekilleri, 4- hidroksi, 10- hidroksi okratoksin ve okratoksin  $\alpha$ 'dır. Okratoksinlerin bu şekillerinin zehirlilikleri ana bileşik olan OTA'ya göre son derece düşüktür. Kültür ortamlarında ve vücutta metil, etil esterleri, tirozin, serin, lisin analogları tespit edilmiştir (Garip, 2000).

Okratoksin A renksiz, kristal yapıda, suda az, polar organik çözücülerde ve seyreltik sulu sodyum bikarbonat çözeltisinde iyi çözülürler. Benzende kristallendiğinde buharlaşma noktası 90 ° C sıcaklıktadır. Ksilenden kristallendirildiğinde ise buharlaşma noktası 169°C sıcaklıktadır. Optik olarak aktiftir. Okratoksin A'nın önemli bir kimyasal reaksiyonu karboksil grubuyla girdiği esterleşme reaksiyonudur. Metil esterleri OTA'nın belirlenmesinde kullanılır. Okratoksin A'nın diazometanla reaksiyonundan sonra O-metilester meydana gelir. Okratoksin A asitle ya da enzim gibi kuvvetli uygulamalarla L –  $\beta$  – fenilalanin ve 7 – karboksi – 5 kloro – 3,4 – dihidro – 8 hidroksi – 3 metilizokumarin'e (okratoksin $\alpha$ ) dönüşebilir. Okratoksin A'nın Fe<sup>+3</sup> kompleksi bir enzimatik redüktaz varlığında hidroksil radikaller ürettiği görülür ve bu radikallerin kısmen OTA'nın toksisitesinden sorumlu olduğu ileri sürülür (Scott, 1996).

Okratoksin A genel olarak stabil bir moleküldür. Etanol solusyonunda buzdolabında bir ya da daha fazla yıl muhafaza edilebilir. Farklı gıdalarda yapılan çalışmalar OTA'nın sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu gösterir. Tomova (1977) ve Scott (1984)'un bu konuda yaptığı çalışmalarda, doğal olarak buğdayda bulunan toksinin 200 ° C'lik sıcaklıktan etkilenmediği, 250-300 ° C sıcaklıkta 40 dakika bekletildiğinde toksinin %32'sinin parçalandığı tesbit edilmiştir. Patterson (1977), Josefson ve Möller (1980) ve Scott (1984), domuz eti ve sakatatların 150-160 ° C sıcaklıkta pişirilmesiyle toksin miktarında %20 azalma meydana gelirken yağ dokusunda bulunan toksinde hiç kayıp olmadığı bildirmektedirler. Okaratoksinle kontamine olmuş unda ekme pişirme sırasında az bir kayıp olduğu gözlenirken, bisküvi yapımında çok daha fazla toksinin parçalandığı bildirilmektedir. Gareis (1996), bu gibi gıdalardaki OTA'nın ısıl stabilitesinin, gıdanın su içeriğine ve ısıl işlem sırasındaki orta noktanın sıcaklığına bağlı olduğunu bildirmiştir (Garip, 2000).

Okratoksin A'nın yarılanma ömrü, Rio ve arkadaşlarının (2000) bildirdiğine göre farelerde 24 – 39 saat, sıçanlarda 55 – 120 saat, domuzlarda 72 – 120 saat, maymunlarda 456 – 504 saat, insanlarda ise 840 saattir (Creppy, 2002).



	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
Okratoksin A	Fenilalanin	Cl	H	H	H
Okratoksin B	Fenilalanin	H	H	H	H
Okratoksin C	Fenilalanin, etilester	Cl	H	H	H
Okratoksin A metilester	Fenilalanin, metilester	Cl	H	H	H
Okratoksin B metilester	Fenilalanin, metilester	H	H	H	H
Okratoksin B etilester	Fenilalanin, etilester	H	H	H	H
Okratoksin $\alpha$	OH	Cl	H	H	H
Okratoksin $\beta$	OH	H	H	H	H
4R-hidroksi-okratoksin A	Fenilalanin	Cl	H	OH	H
4S-hidroksi-okratoksin A	Fenilalanin	Cl	OH	H	H
10-hidroksi-okratoksin A	Fenilalanin	Cl	H	H	OH
OTA- Tirosin analogu	Tirosin	Cl	H	H	H
OTA- Serin analogu	Serin	Cl	H	H	H
OTA-hidroksiprolin analogu	Hidroksiprolin	Cl	H	H	H
OTA- Lisin analogu	Lisin	Cl	H	H	H

Şekil 2.1 Okratoksin A'nın kimyasal yapısı ve ilgili metaboloitleri (Höhler,1998)

## 2.2. Okratoksin A'nın Sağlık Üzerine Etkisi

Okratoksin A'nın nefrotoksik (üregenital sistem üzerine etkili), immunosupresif (immun sistem üzerine baskılayıcı), karsinojenik, teratojenik (anormal oluşum sebebi), genotoksik (genom üzerine etkili) etkileri olmasının yanında protein sentezi üzerine ve merkezi sinir sistemine etkileri olduğu belirlenmiştir (Gümüş, 2002; Höhler, 1998).

Okratoksin A, t-RNA sentetaz enzimiyle yarışarak enzimi engellemekte ve böylece protein sentezini durdurmaktadır. Merkezi sinir sistemi üzerine etkisini dopamin düzeyini azaltıp, noradrenalin ve serotonin seviyelerinin arttırarak gerçekleştirmektedir. Karsinojenik ve mutajenik etkilerini açıklamaya yönelik kesin bir bilgi yoktur. Denekler üzerinde yapılan çalışmalarda böbrek ve karaciğerde tümörlerin gelişmesine yol açtığı bildirilmiştir. Okratoksinlerin karsinojenik etkisi, lipit peroksidasyonunu arttırıp, serbest radikallerin açığa çıkmasına ve immun sistemin baskılanmasına bağlanmaktadır (Höhler, 1998, Garip, 2000).

Gebeliğin ilk üçte birlik döneminde bir kez dahi okratoksine maruz kalan denek hayvanlarında, beyinde sıvı toplanmasına, kalp bozukluklarına, göz, dudak ve damakta şekil bozukluklarına, hareket organlarında malformasyona sebep olduğu bildirilmektedir (Garip, 2000). Hamileliklerinin 8, 9, 10, 15, 16 ve 17. günlerinde farelere vücut ağırlığına göre 3 – 5 mg/kg düzeyinde OTA verilmiş, 15 – 17. günlerde deneklerin pek çoğunda beyinsel gangrene rastlanmıştır (Kiremit, 1993).

İnsanlarda Balkan Endemik Nefropatisi (BEN), domuzlarda Danimarka böbrek nefropatisi ve ayrıca kümes hayvanlarındaki önemli bir sağlık sorununun muhtemel kaynağının OTA olduğu belirlenmiştir. Balkan Endemik Nefropatisi görülen bölgelerden alınan toplam 1553 gıda örneğinin %10,3'ünde yüksek miktarda OTA saptanırken, bu bölgelerdeki insanların %9,8 - %13,5'inin kanlarında OTA'ya rastlanmıştır. Bulgaristan'da endemik nefropati görülen bölgelerden alınan fasulye ve mısır örneklerinde kontrol bölgelerine göre 2 – 3 kat daha fazla miktarda OTA tespit edilmiştir (Karagözlü, 1998).

Okratoksin A ile kontamine olmuş yemlerin tüketilmesiyle toksin, hayvanlarda kan, böbrek, karaciğer, kas gibi farklı dokulara dağılmaktadır. Okratoksin A yağda çözündüğü ve dışarıya salgılanmadığı için özellikle yağlı dokularda birikmekte ve bu şekilde toksin içeren dokunun tüketilmesi ile insana geçmektedir (Karagözlü, 1998).

Okratoksin miktarının denekler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 1,4 ppm verilen deneklerde aşırı susama, sıkça idrar atma, düşük büyüme oranı ve düşük besin alımı gerçekleşmiştir. Her gün 1,0 ppm OTA verilen deneklerde 14 günde depresyon, düşük kilo alımı, böbrek ve barsak iltihaplanması görülmüştür; 2,0 ppm OTA verilen deneklerde 14 günde pıhtılaşma düzensizliği tespit edilmiştir (Kap Pazarbaşı, 2002).

10 mg/kg vücut ağırlığı oranında tek dozda OTA verilen fareler üzerinde yapılan bir araştırmada ilk 4 saatte OTA seviyesinin en yüksek olduğu dokunun mide duvarı olduğu saptanmıştır. Kalın ve ince bağırsakta da az miktarda değişime uğramış OTA bulunmuş ve OTA'nın esas olarak midede absorbe edildiği sonucuna varılmıştır (Kiremit, 1993). Okratoksin A sulu solusyonlarda monoanyon ve dianyon olarak bulunmasına karşın asidik ortamlarda nötr olarak bulunmaktadır ve asidik karakterde olan gastrointestinal bölgede hızlıca absorbe edilmektedir (Ringot ve ark., 2005).

Uluslararası Kanser Araştırma Dairesi (IARC) OTA'yı insanlarda muhtemel kanserojen sınıflandırması olan 2B sınıfı içerisine dahil etmiştir (Leoni ve ark., 2000). Kuiper – Goodman ve Scott (1993), deneysel hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaların sonuçlarına bağlı olarak insanların günlük tolere edebilir OTA miktarını 0,2 – 4,2 ng/kg vücut ağırlığı olarak belirlemişlerdir. Scott (1993), vücudun günlük olarak alınan 5 – 16 ng/kg vücut ağırlığı kadar OTA miktarını tolere edebildiğini bildirmiştir. WHO'ya göre bu oran 16 ng /kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlenmiştir. Zimmerli ve Dick (1996)'e göre erkeklerde 0,7 ng OTA/kg vücut ağırlığı olarak belirtilirken çocuklarda ise 100 pg OTA/ml'den az olması gerektiğini bildirmişlerdir. FAO ve WHO'nun Kodeks Alimentarius Komisyonuna göre ise, 1,2 – 14 ng OTA/ kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (Gümüş, 2002).

### 2.3. Okratoksin Üreten Küfler ve Gelişme Şartları

Okratoksin A, çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* küfleri tarafından sentezlenir. Okratoksin A, adını Scott (1965) tarafından ilk kez izole edildiği *A. ochraceus*'tan alır. Daha sonraki çalışmalarda OTA ürettikleri belirlenen *Aspergillus* türleri: *A.ochraceus*, *A.alliaceus*, *A.scleratorum*, *A.ostianus*, *A.melleus* ve *A.sulphureus*, *A.auricomus*, *A.petrakii*, *A.albertensis*, *A.niger*, *A.carbonarius*, *A.glaucus*.; *Penicillium* türleri: *P.verrucosum*, *P.cyclopium*, *P.variable*, *P.viridicatum*, *P.palitanis*'tır (Bucheli ve Taniwaki, 2002; Gümüş, 2002, Bayman ve ark., 2002; Larsen ve ark., 2001).

Okratoksin A üretiminden sorumlu olan *Penicillium* ve *Aspergillus* küflerinin gelişme sıcaklıklarının ayrı olmasından dolayı farklı iklimlere sahip coğrafi bölgelerde ve gıda çeşidine bağlı olarak herhangi bir toksin varlığı sonucunda hangi küfün mikotoksinde sorumlu olduğu belirlenebilir (Martins ve ark., 2003). Soğuk iklimlerde *Penicillium* küfleri üreme koşullarını sağlayabilirken ılıman iklimlerde *Aspergillus* türleri toksin üretiminden sorumludur (Mantle, 2000).

Gıdalarda oluşan mikotoksinlerin detoksifikasyonu ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, tam olarak etkili ve güvenilir bir yöntem henüz yoktur ve bu nedenle mikotoksinlerin oluşumunun önlenmesi, kontrolde en önemli noktayı oluşturur. Bu aşamada mikotoksinlerin oluşumunun önlenmesi için küflerin gelişme şartları ve hangi koşullarda toksin üretme kabiliyeti kazandıkları iyi bilinmelidir (Ünlütürk ve Turantaş, 1999).

Mikotoksinlerin üretiminde ve kontrolünde sıcaklık ve nem miktarı önemli bir faktördür. Pitt ve Christian (1968), *A.ochraceus*'un 8-37°C sıcaklık aralığında gelişme gösterdiğini belirtmekle beraber optimum gelişme sıcaklık aralığının 24-31°C olduğunu, optimal gelişme gösterdiği ortamın su aktivitesinin ise 0,95-0,99 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Ramos ve ark. (2003) *A.ochraceus*'un gelişmesine su aktivitesi ve sıcaklığın etkisi üzerine çalışma yapmışlar ve sonucunda; sıcaklık 30°C olduğu zaman gelişme gösterdiği minimum su aktivitesinin 0,80; 10°C olduğu zaman 0,90 olarak

değiştirdiği; optimum gelişebildikleri büyüme sıcaklık aralığının 20 - 30°C ve su aktivitesi değerinin ise 0,95 – 0,99 aralığında olduğunu belirtmişlerdir (Pardo ve ark., 2004b).

*A.niger* 6-47°C sıcaklık aralığında gelişme gösterir. Optimum sıcaklık aralığı 35-37°C'dir. *A.niger*, sıcak iklimlerde sık görülür. Fakat genellikle toksijenik değildir (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Tropik iklimlerde önemli olan OTA üreticisi *A.carbonarius*'tur. 8-41°C sıcaklık aralıklarında gelişir, optimum sıcaklık aralığı 35-37°C, optimum gelişebildiği su aktivitesi 0,90'dır (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

*P.verrucosum*, düşük su aktivitesinde ve düşük sıcaklıklarda gelişebilme özelliğine sahiptir; 0-31°C sıcaklık aralığında gelişebilirler. Sıcaklık 20°C olduğu zaman gelişme gösterdiği minimum su aktivitesi 0,80'dir. (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

*A. carbonarius* M333 suşunun sıcaklık ve su aktivitesine bağlı olarak küf gelişimi ve OTA üretiminin kahve çekirdekleri üzerinde incelendiği çalışmada *A.carbonarius*'un 25°C sıcaklıkta 0,99 ve 0,94 su aktivitesi değerlerinde iyi gelişme gösterdiği, sırasıyla 4810 µg/kg ve 230 µg/kg düzeyinde OTA ürettiği belirlenmiştir. Aynı sıcaklık derecesinde 0,90 su aktivitesi değerinde yavaş gelişme göstermiş ve 2 µg/kg'dan daha az miktarda OTA üretmiştir, 0,85'te ise gelişme olmamışken OTA üretimi de tespit edilmemiştir. 20°C sıcaklıkta  $a_w = 0,90$ 'da gelişme hızlı olmuş ve küfün 3380 µg/kg OTA ürettiği, 27°C ve 30°C sıcaklıkta 0,99  $a_w$  değerinde de hızlı gelişme görülüp sırasıyla 4490 µg/kg ve 2790 µg/kg OTA üretimi saptanmıştır. 35°C ve 37°C sıcaklıkta  $a_w = 0,99$ 'da yavaş gelişme göstermiştir. 35°C sıcaklıkta 7 µg/kg OTA üretimi belirlenmesine karşın, 37°C sıcaklıkta OTA üretimi belirlenmemiştir (Joosten ve ark., 2001).

Taniwaki ve ark. (2001), kabuklu çığ kahvede *A.carbonarius* ve *A.ochraceus*'un ürettiği OTA'nın oluşma koşulları üzerinde su aktivitesinin rolünü araştırdıkları

çalışmalarında  $a_w = 0,80$ 'de (yaklaşık %14 nem içeriği) OTA üretiminin az olduğu görülmüştür. *A.ochraceus*'un  $0,15 \mu\text{g}/\text{kg}$  ve *A.carbonarius*'un da  $0,40 \mu\text{g}/\text{kg}$  OTA ürettiği saptanmıştır.  $a_w$  değeri  $0,87$ 'ye çıktığında (yaklaşık %20 nem) ve  $0,95$ 'e çıktığında (%30 nem) *A.ochraceus*'un önemli miktarda OTA ürettiği görülmüştür. Üretilen OTA miktarının  $a_w = 0,87$ 'de  $2500 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $a_w = 0,90$ 'da  $7200 \mu\text{g}/\text{kg}$  olduğu belirtilmiştir. Buna karşın *A.carbonarius* daha düşük miktarda OTA üretmiştir. Su aktivitesi  $a_w = 1,00$ 'de *A.carbonarius*'un ürettiği OTA miktarı  $9,6 \mu\text{g}/\text{kg}$  seviyesinde kalmıştır (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Kahve çekirdeklerinin yüksek nem içermelerinden dolayı kurutma işlemi, OTA üretimi için tehlikeli olabilecek bir aşamadır. Kurutmanın başlangıcında, çekirdekler %59-63; kurutmanın 5. gününde %25-50 düzeylerinde su içerirler. Bir çok kurutma aşamasında OTA oluşumunu inceleyen çalışmada, OTA kontaminasyonunun kurutmanın ilk beş günü içerisinde olduğu ve 15-20 gün içerisinde de arttığı gözlenmiştir. Kurutma işlemi sonrasında küf gelişimini önlemek için nem içeriği %12'den az olmalıdır (Cabrera ve ark., 2004). Dört ardışık hasat sezonunda yapılan incelemede (1996–1999) kabuklu ve kabuksuz kahve çekirdeklerinde güneşte kurutma sırasında dört hasat zamanında da OTA belirlenmiştir (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Kahve çekirdeklerinin yüksek nem içeriğine sahip olması *Aspergillus* türlerinin dışında, *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* ssp. ve mayalar için de uygun substrat olması için yeterlidir. Kahve çekirdekleri üzerinde bu küflerin üremesi *A.ochraceus*, *A.niger* ve *A.corbonarius*'un üremesine engel olarak OTA üretimini de engelleyebilir (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

#### **2.4. Kahvede OTA Üreten Küflerin Varlığı ve OTA Üretimi**

Yeşil kahvede, Levi ve ark. (1974) tarafından OTA bulunmasından bu yana çalışmalar devam etmiştir. Kahve çekirdeklerinin doğrudan OTA ile kontaminasyonu topraktaki soprafitik küf faaliyeti ve doğrudan kahve çekirdeklerinde küf gelişmesiyle

olduğu ileri sürülür (Viani, 2002; Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Yapılan çalışmalar sonucu, kahvede küf gelişiminden *A.carbonarius*, *A.niger* ve *A.ochraceus*'un sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Pitt ve ark (2001), Brezilya'da dört kahve üreticisinden 408 kahve örneğini incelemiş ve bu kahve örneklerinde bu üç türün dağılımını gösteren bir çalışma yapmışlardır. En fazla bulunan *A.niger*, 872 izolattan 550'sinde bulunmuştur, fakat bunların yalnızca %3'ünden OTA izole edilmiştir. 270 örnekte *A.ochraceus* bulunmuştur, bunun %75'i OTA üretmekle beraber depolamada ve kurutmada büyük oranda canlılıklarını sürdürmüşlerdir. *A.carbonarius* ise 54 örnekte bulunmuş ve %77 oranında OTA ürettiği saptanmıştır. *A.carbonarius* da *A.ochraceus* gibi depolamada ve kurutmada varlık göstermiştir (Taniwaki ve ark., 2003).

Heenan ve ark. (1998) tarafından ıslak yöntem uygulanan çekirdeklere kurutmadan sonra yapılan incelemede çekirdeklere %90 oranında *A.carbonarius*, %2 oranında *A.niger* tespit edilmiştir. *A.carbonarius*'un OTA üretmesi üzerine yapılan diğer çalışmalarda Ciegler (1972), %30 oranında *A.carbonarius*'un OTA ürettiğini saptamışken, Chourasia (1995) bu oranı %16 olarak bulmuştur (Taniwaki ve ark., 2003).

Romani ve ark. (2000)'nın Afrika'da, Orta ve Güney Amerika'da yaptıkları çalışmada Afrika'dan alınan 84 yeşil kahve numunelerinde örneklerin 76'sında OTA bulunduğu ve OTA'nın ortalama düzeyinin 4,7 µg/kg olarak bulunduğu açıklanmıştır. Orta ve Güney Amerika'da yaptıkları çalışmada ise 60 örnekten 19'unda OTA bulunduğu ve ortalama düzeyin 0,5 µg/kg olduğu belirtilmiştir (Bucheli ve Taniwaki, 2002). Patel ve ark. (1997)'nin Amerika'da satışa sunulan kahvelerde OTA varlığını araştırdıkları çalışmada 100 kahve numunesi analiz edilmiş, 100 örneğin 81'inde OTA belirlenmiştir (Vega ve Mercadier, 1998).

Çiğ kahvede yapılan araştırmada 29 numuneden 5, 10, 30 kg'lık örnekler alınmış ve OTA varlığı incelenmiştir. 5 kg'lık örneklerin 11'inde, 10 kg olan örneklerin 12'sinde ve 30 kg'lık örneklerin 12'sinde olmak üzere toplam 87 numunenin 35'inde OTA tespit

edilmiştir (Sommerfeld ve Gabel, 2002).

Bir başka çalışmada yeşil kahvelerde %70-73 oranları arasında fungal bulaşma gözlenmiştir. Analiz edilen 240 Robusta kahvesinin %70,4'ünde, 615 Arabica kahvesinin %73,3'ünde küf bulunmuştur. Küflerin %93'ünü *Aspergillus* türleri oluşturmuştur. Her iki kahve çeşidinde de *A.ochraceus* düşük oranda bulunmuştur. *A.section Nigri*, Arabica kahvesinde %67,4, Robusta kahvesinde %86,9 oranlarında bulunmuştur. İncelenen örneklerde ortalama OTA düzeyi 6,7 µg/kg olmakla beraber 1,3 – 31,5 µg/kg arasında değişme göstermiştir. Okratoksin A düzeyi Arabica ve Robusta kahveleri arasında önemli ölçüde farklılık göstermemiştir. Örneklerin %52,6'sında OTA düzeyi 5 µg/kg'dan, %59,7'sinde 8 µg/kg'dan, %7'sinde 20 µg/kg'dan yüksek çıkmıştır. (Pardo ve ark., 2004a).

Mislivec ve ark. (1983) yeşil kahve örneklerinin %93'ünde fungal bulaşmaya rastlamışlardır. Bucheli ve ark.(1998) OTA üreten küfleri ve OTA'yı, depolanan yeşil kahve örneklerinde bulamamıştır, fakat bunun tersine Urbano ve ark. (2001) çalışmalarında yüksek oranda OTA üreten küf bulmuştur. Test edilen örneklerde %88,1 *A.ochraceus*, %11,5 *A.niger* bulunmuştur ve örneklerin %75'inde OTA, 0,2 µg/kg düzeyini aşmıştır. Frank (1999), yaptığı çalışmada kahve çekirdeklerinde *A.ochraceus* bulmasına rağmen yüksek oranda OTA düzeyine rastlamamıştır (Pardo ve ark., 2004a).

İnceledikleri yeşil kahve örneklerinde Cantafora ve ark. (1983) 0,5 – 23 µg/kg, Tsubouchi ve ark. (1985) 9,9 – 46 µg/kg, Micco ve ark.(1989) 0,2 – 5,5 µg/kg, Nakajima ve ark.(1997) 0,1 – 17,4 µg/kg, Trucksess ve ark. (1999) 0,1 – 4,6 µg/kg, Romani ve ark. (2000) 0 - 48 µg/kg aralıklarında OTA miktarlarını bulmuşlardır (Batista ve ark., 2003). 1996'da Tayland'da dokuz çiftlikte yapılan bir araştırmada kurutulmuş kahve çekirdeklerinde yüksek düzeyde OTA'ya rastlanmıştır. Bir çiftlikte çekirdekte OTA düzeyi 1206 µg/kg olarak bulunmuştur (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Kahve çekirdeklerinin OTA üreten küflerle kontaminasyonu, çekirdeklerin ağaçta olgunlaşması sırasında da olabilir. OTA kontaminasyonu, yeşil kahvede çekirdeklerin

olgunluğuna da bağlıdır ve fazla olgunlaşmış çekirdekler OTA ile daha kolay kontamine olurlar. Özellikle dış kabuğu soyulmamış çekirdeklerde kabuk önemli derecede OTA içerir. Kabuktaki yüksek OTA varlığı kabuk soyma aşamasında OTA'nın yeşil kahveye bulaşma olasılığını arttırır. Olgun çekirdeklerin ağaçta kuruması OTA üreten küfler için muhtemel substrat oluşturur. Teixeira ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada olgun çekirdeklerde OTA düzeyi 0,12 µg/kg olarak bulunmuşken, fazla olgun çekirdeklerde 0,2 µg/kg olarak bulunmuştur. Çekirdekler fazla olgunlaşmadan hasat edilmeli ve işlenmelidir. Fazla olgunlaşma, çekirdeklerin fermente olmasına, hasar görmesine sebep olabilir ya da toprağa düşebileceğinden dolayı OTA düzeyini yükseltebilir ve kurutmada hızlıca yayılabilecek OTA üreten küflerin üremesini kolaylaştırabilir. Kurutmadan önce çekirdekler plastik kaplarda bekletilmemelidir. Çünkü bu uygulama fermentasyona ve küf gelişimine neden olabilir, kahvenin duysal özelliklerini olumsuz etkiler. Çekirdeklerin kurutulması temiz bir yerde yapılmalı, kabuğunu soyma işlemi uygun koşullar altında yapılmalıdır (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Kahve cinsinin OTA düzeyi üzerindeki etkisi üzerine yapılan bir çalışmada Robusta cinsi yeşil kahvelerin, Arabica cinsine göre OTA bulunmasının daha muhtemel olduğu görülmüştür. Yapılan alışmada 119 Arabica kahvesinin %50'si OTA ile kontamine olmuşken 50 Robusta kahvesinin %78'inde OTA bulunmuştur (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Bucheli ve ark. (1998) OTA ve küf üzerine yeşil kahve depolanmasının etkilerini incelemiştir. Test edilen depolama koşulları altında, tutarlı bir OTA üreten küf varlığı ve OTA üretimi belirlenmemiştir. Bu alışmada, *A.fumigatus*, *Aniger*, *A.section Restricti*, *Penicillium spp.* ve *Wallemia sebi* küfleri bulunmuştur (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Teixeira ve ark. (2001) Brezilya'da OTA varlığına etki eden uygunsuz depolama koşulları üzerine yaptıkları çalışmada 135 kahve çekirdeği örneğini analiz etmişlerdir ve 9 örnekte OTA konsantrasyonunun 5 µg/kg üzerine çıktığını belirtmişlerdir. En fazla çıkan konsantrasyon, tamamen kurutulmamış, nemli bir ortamda depolanan bir örnekte 109 µg/kg olarak bulunmuştur. İyi kurutulmuş çekirdekler (%10-12 nemli) %50-70 bağıl nemli alanda

depolanabilir. Sıcaklığın da 20°C'nin altında tutulması gereklidir. Taniwaki ve ark. (2001)'nin çalışmasında da %10-12 nem ve %50-70 bağıl nemin bulunduğu ortamlarda yeşil kahvelerin kalite kaybına uğramadan güvenle depolanabildiği görülmüştür (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

## **2.5. Kavurma İşleminin OTA'ya Etkisi**

Okratoksin A'nın tahıllarda 250°C sıcaklıkta dahi tamamen yok olmadığı çok yüksek sıcaklıklarda bile var olabildiği farklı bir çok çalışmada bulunmuştur. Okratoksin A ile kontamine olmuş kahve çekirdeklerine kavurmanın etkisi üzerine yapılan bir çok çalışmada kavurmanın OTA düzeyini azalttığı görülmüştür. Fakat bu çalışmalarda OTA'nın kaybolma aralığı ile ilgili bulgular çok farklıdır. Tsubouchi ve ark. (1987) kavurma işleminden sonra OTA kaybının %0-12 oranları arasında azaldığını, Levi ve ark. (1974) ve bu oranın %50-100 olduğunu belirtmişlerdir. Bu durumu, kavurma işlemi, homojen olmayan kahve çekirdeği kontaminasyonu, OTA düzeyi gibi bir çok faktör etkileyebilir (Lobeau ve ark., 2005; Martins ve ark., 2003).

Kavrulmuş ve öğütülmüş kahvede OTA varlığı üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde ortalama OTA düzeyinin 1 µg/kg'dan az olduğu görülmektedir. Cantofara ve ark. (1983) yaptıkları çalışmada 3,8 ve 23 µg/kg düzeyinde OTA tespit edilen iki yeşil kahvede, kavurma sonrasında OTA tespit edememişlerdir. Benzer bir sonuç Micco ve ark. (1989) tarafından da bulunmuştur. 4 ve 8,6 µg/kg düzeyinde bulaşma olmuş iki yeşil kahvede kavurma sırasında %90-100 oranlarında OTA düzeyinde azalma görülmüştür. Buna karşın Studer-Rohr ve ark. (1994) kavurmanın %14-62 oranda OTA azalmasını sağladığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın laboratuvar ortamında yapıldığı ve sadece 3 dakika süreyle kavurma işleminin yapıldığına dikkat edilmelidir (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Kavurma işleminin OTA üzerine etkisinin araştırıldığı en geniş kapsamlı çalışma Blanc ve ark. (1998) tarafından yapılmıştır. 3 tonluk yeşil kahve örneği üzerinde yapılan

çalışmada , OTA ile bulaşık kahvede kavurma sonrası OTA düzeyinde %16'lık bir azalma gözlenmiştir (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Heilmann ve ark. (1999), kavurma işleminin kahvede OTA'nın dekontaminasyonu için etkili bir yol olduğunu onaylamışlardır. Aynı zamanda dekafeinasyon işleminin OTA düzeyini azaltmak için diğer bir yöntem olduğunu belirlenmiştir (Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Bir araştırmada 34 kavrulmuş ve öğütülmüş kahve örneğinde yapılan çalışma sonucunda 24'ünün OTA ile kontamine olduğunu ve OTA düzeylerinin 0,3 – 6,5 ng/g arasında değiştiğini, örnekler arasındaki ortalama değerin ise 0,9 ng/g olduğu belirtilmiştir (Leoni ve ark., 2000)

## **2.6. Kahve bileşenlerinin OTA üretimi üzerine etkileri**

Klorojenik asit ve kafein gibi kahve bileşenlerinin mikotoksin üretimini inhibe edici etkisi olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Klorojenik asitler kahvenin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. İz miktarlarda bulunan Quinik asitlerin daha büyük miktarları quinik asitlerin serisi olarak bulunur. Bunlar klorojenik asitler olarak bilinir. Kafein ise kahvenin önemli bir alkaloididir. Moleküler formülü 1,3,7-trimetilxanthin veya 1,3,7 – Trimetil 2,6 – dioxipurin'dir (Çağlarımak, 1994). Kahvedeki kafein ve klorojenik asit içeriğinin *A.ochraceus*'un gelişmesine ve toksijenitesine etki edebileceği düşünülerek yapılan bir çalışmada klorojenik asit içeriğinin *A.ochraceus*'un gelişmesi üzerine fazla etkili olmadığı, kafeinin ise gelişmeyi engelleyici yönde bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Okratoksin A üretimini her iki bileşiğin de etkilediği görülmüştür. 2 mg/ml kafein ve 8 mg/ml klorojenik asit içeriğine sahip kahvede OTA konsantrasyonu sıfıra yaklaşmaktadır. Bununla beraber iki bileşenin beraber kullanımlarındaki OTA düzeyi sadece kafein kullanıldığında yapılan çalışmada bulunan değere eş bir değer olduğu, bu sebeple kafein ve klorojenik asitin birbirlerine sinerjistik etkide bulunmadıkları görüldü. Bresch ve ark. (2000) Avrupa'da 633 kahve örneğinde yaptıkları araştırma sonucunda kafeinli kahvelerde OTA varlığı 0,8 µg/kg düzeyinde olurken dekafeinasyon işlemi görmüş kahvelerde ise bu oranın

0,7 µg/kg düzeyinde kaldığını bildirmiştir. Almanya'da yapılan bir çalışmada ise kafeinli ve kafeinsiz kahve örneklerinde OTA ortalama 0,6 µg/kg arasında bulunmuştur. Bu çalışma sonucu da kahvenin içeriğinde OTA üretimini inhibe edecek bileşikler olduğunu göstermektedir (Quiroz ve ark., 2004; Bucheli ve Taniwaki, 2002).

Dört kahve numunesinde dekafeinasyon işleminin OTA varlığı üzerine yapılan çalışmada işlemin OTA miktarını azalttığı belirlenmiştir. OTA miktarının 1. örnekte 6,2 ppb'den 1,3'e; 2. örnekte 4,7 ppb'den 1,7'ye; 3. örnekte 8,7 ppb'den 0,9'a ve 4. örnekte 6,5 ppb'den 1,2'ye düştüğü tespit edilmiştir (Heilmann ve ark., 1999)

## **2.7. Kahvede OTA miktarını belirleyen yasal düzenlemeler**

Avrupa Birliği (AB), 12 Mart 2002'de aldığı kararla ham tahılda 5 µg/kg, tahıl ürünlerinde 3 µg/kg, ve kuru üzümde 10 µg/kg olarak OTA düzeylerini belirlemesine rağmen kahvede henüz bu sınırlar belirlenmemiştir (Lobeau ve ark., 2005). Ulusal düzeyde belirleyen ülkeler Çizelge 2.1.'de belirtilmiştir.

Türkiye'de 2002'de yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Tebliği'nde işlenmemiş tahıl tanelerinde, tahıl ürünlerinde ve kuru üzümde OTA sınırları belirlenmiş olup, AB'nin belirlediği değerlerle aynıdır (Anon., 2002b).

Çizelge 2.1. Kahvede OTA için ulusal düzeyde belirlenen maksimum limitler ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  
(Anon., 2005).

	Yeşil Kahve	Kavrulmuş Kahve	Çözünebilir Kahve
Çek Cumhuriyeti	10	10	10
Finlandiya	5	5	5
Almanya	-	3	6
Yunanistan	20	-	-
Macaristan	15	10	10
İtalya	8	4	4
Hollanda	-	10	10
Portekiz	8	4	4
İspanya	8	4	4
İsviçre	5	5	5

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

Türkiye'nin farklı bölgelerinden olmak üzere toplam 44 adet kahve örneği piyasadan tesadüf örnekleme yöntemine göre toplanmıştır. Örnekler laboratuara getirilip analizleri yapılmaya kadar buzdolabında saklanmıştır.

### **3.2. Metot**

#### **3.2.1. Okratoksin A Analizi (Elisa Metodu)**

Kahve örnekleri 5 g tartılarak bir erlen içine alınmıştır. 12,5 ml %70'lik Methanol (methanol:su) ile 3 dakika çalkalandıktan sonra Whatman 1 filtre kağıdından süzölmüştür. Filtrasyondan 1 ml alınıp 1 ml distile su ile sulandırılmış ve 50 µl alınarak test işlemlerine geçilmiştir (Anon., 2006b).

Standartlar önce 0 µg/kg (ppb), 5 µg/kg, 10 µg/kg, 20 µg/kg, 40 µg/kg olarak içerisine OTA antibody bulunan mikrotiter platedeki çukurluklara aktarılmış ve daha sonra ekstraktlardan 50 µl sonraki viallere konulmuştur. Üzerine 50 µl enzim konjuge ve 50 µl okratoksin A antibody konularak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 3 defa saf su ile yıkanmıştır. Üzerine 100 µl substrat/kromogen ilave edilmiş, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 100 µl durdurma solusyonu ilave edildikten sonra 10 dakika içinde "ELx800 Serisi Microplate Reader" da 450 nm'de absorbands değerleri okunmuştur. Sonuçlar bilgisayar ortamında özel program ile otomatik olarak hesaplanmıştır (Anon., 2006b).

#### **3.2.2. Mikrobiyolojik analizler**

##### **3.2.2.1. Toplam koliform sayımı**

90 ml peptonlu su üzerine 10 g örnek tartılarak  $10^{-1}$ 'lik dilüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra 9 ml peptonlu su üzerine  $10^{-1}$ 'lik dilüsyondan 1 ml eklenerek  $10^{-2}$ 'lik dilüsyon elde edilmiştir. Bu dilüsyondan 1 ml toplam VRBA (Violet Red Bile Agar) ekim yapıp 35 °C sıcaklıktaki etüvde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda gelişen kırmızı koloniler toplam koliform olarak kaydedilmiştir (Baumgart, 1993).

### 3.2.2.2. Toplam mezofil canlı bakteri sayımı

3.2.2.1'de hazırlanan  $10^{-2}$ 'lik dilüsyondan PCA (Plate Count Agar) ekim yapıp 32 °C sıcaklıktaki etüvde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Gelişen koloniler toplam mezofil canlı bakteri olarak kaydedilmiştir (Baumgart, 1993).

### 3.2.2.3. Küf sayımı

3.2.2.1'de hazırlanan  $10^{-2}$ 'lik dilüsyondan 1 ml küf ve maya PDA (Potato Dextrose Agar) ekim yapıp 25 °C sıcaklıkta 3 gün inkübe edilmiştir (Baumgart, 1993).

### 3.2.3. Rutubet miktarının belirlenmesi

103°C +/- 2°C sıcaklıkta sabit ağırlığa kadar ısıtıldıktan ve desikatörde soğutulduktan sonra darası alınmış kurutma kabına yaklaşık 5 g numune tartılmıştır. Kurutma kabı etüvde 103°C +/- 2°C sıcaklıkta 6 saat kurutulduktan sonra soğutulup tartılmıştır. Yeniden etüve konularak aynı sıcaklıkta 30 dakika bekletilmiş, desikatörde soğutulup yeniden tartılmıştır. Birbiri ardına yapılan iki tartım arasındaki fark 1 mg'dan az oluncaya kadar işleme devam edilmiştir ve en düşük değer kaydedilerek aşağıdaki formüle göre % rutubet miktarı hesaplanmıştır (Anon., 1978).

$$R = \frac{100 (m_1 - m_2)}{m_1 - m}$$

Burada,

$m_1$  = Kurutma kabının içindeki öğütülmüş kahve ile kurutma kabının ağırlığı, g

$m_2$  = Kurutma kabının içindeki öğütülmüş kahve ile kurutma kabının kurutmadan sonraki ağırlığı, g

$m$  = Boş kurutma kabının ağırlığı, g

#### **3.2.4. İstatistiksel Analizler**

İstatistik analizlerde SPSS paket programı kullanılmıştır. Analiz sonuçları kahve örneklerinde istatistiki olarak değerlendirilmiş, örnekler arasındaki farkı belirlemek amacıyla tamamen şansa bağlı deneme planında varyans analizi yapılmıştır. Önemli bulunan varyasyon kaynakları çoklu karşılaştırma testi olan Duncan testine tabi tutulmuştur (Soysal, 1998). Araştırma iki tekerrürlü yapılmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

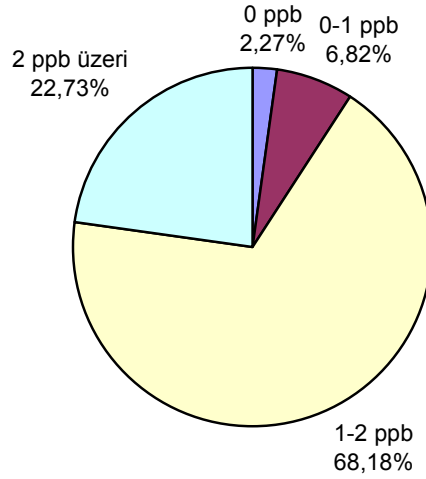
##### 4.1. Kahve Örneklerinde Okratoksin A (OTA) Miktarı

Bu araştırma çerçevesinde 44 adet kavrulmuş ve öğütülmüş kahve örneği okratoksin A (OTA) içeriği bakımından incelenmiştir. Buna göre kahve örneklerinin % 2,27'sinde OTA bulunmazken % 97,73'ünde 0,56 ile 2,6 ppb arasında OTA tespit edilmiştir. Tespit edilen örnekler ve miktarları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kahve örneklerinde bulunan OTA miktarları ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ppb).

Örnek No	OTA miktarı (ppb)	Örnek No	OTA miktarı (ppb)
1	2,6	23	0,56
2	1,67	24	1,76
3	1,21	25	1,82
4	1,6	26	1,27
5	2,38	27	1,2
6	0,77	28	1,21
7	-	29	1,06
8	2,09	30	1,12
9	1,26	31	1,38
10	1,1	32	2,18
11	1,15	33	1,64
12	2,27	34	1,36
13	1,26	35	2,12
14	1,1	36	1,6
15	1,15	37	1,2
16	1,42	38	1,07
17	1,41	39	1,43
18	2,48	40	2
19	0,88	41	1,63
20	1,36	42	1,09
21	1,91	43	2,29
22	1,26	44	2,07
<b>Minimum</b>			-
<b>Maksimum</b>			<b>2,6</b>
<b>Ortalama</b>			<b>1,4575</b>

Kahve örneklerinin %2,27'sinde OTA tespit edilmezken, %6,82'sinde 0-1 ppb arasında OTA değeri bulunmuştur. Buna karşılık %68,18'inde 1-2 ppb arasında ve %22,73'ünde ise 2 ppb'nin üzerinde OTA tespit edilmiştir. OTA konsantrasyonlarına göre kahve örneklerinin dağılımı Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. OTA konsantrasyonlarına göre kahve örneklerinin dağılımı

Tespit edilen değerler Leoni ve ark. (1987)'nin bulduğu değerler ile benzerlik gösterirken, Romani ve ark. (2000)'nin Orta ve Güney Amerika'da inceledikleri kahve örneklerinin sonuçlarından yüksek, Afrika'da yaptıkları inceleme sonuçlarından, Sanchis ve ark. (2004)'nin, Teixeira ve ark. (2001)'nin bildirdikleri değerlerden düşük bulunmuştur. Kahve örneklerindeki OTA miktarı üretim ve depolama şartlarına göre değişkenlik göstermektedir.

Kahve örneklerinin OTA düzeylerindeki farklılıklarını belirlemek için varyans analizi yapılmış sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kahve örneklerinin OTA düzeylerine ait varyans analiz sonuçları.

<b>Varyans Analiz Tablosu</b>	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri
<b>Muamele</b>	43	24,597	0,5720	544,0
<b>Hata</b>	44	0,036	0,0008	
<b>Genel</b>	87	24,633		

\*p<0,01 düzeyinde önemli

Varyans analiz sonuçlarına göre örnekler arasındaki farklılıklar p<0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Önemli bulunan örneklere Duncan testi uygulanmıştır.

Kahve örneklerinden 1'i hariç tüm örneklerde OTA tespit edilmiştir. Örneklerin 10 adedinde tespit edilen OTA miktarı, 2 ppb ve üzerinde çıkmıştır. Kahve örneklerinden 30 adedi 1 - 2 ppb'nin arasında yer alırken, 3 adedinde 0 ppb ile 1 ppb arasında OTA miktarı tespit edilmiştir. 1 örnekte ise OTA tespit edilmemiştir.

## 4.2. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

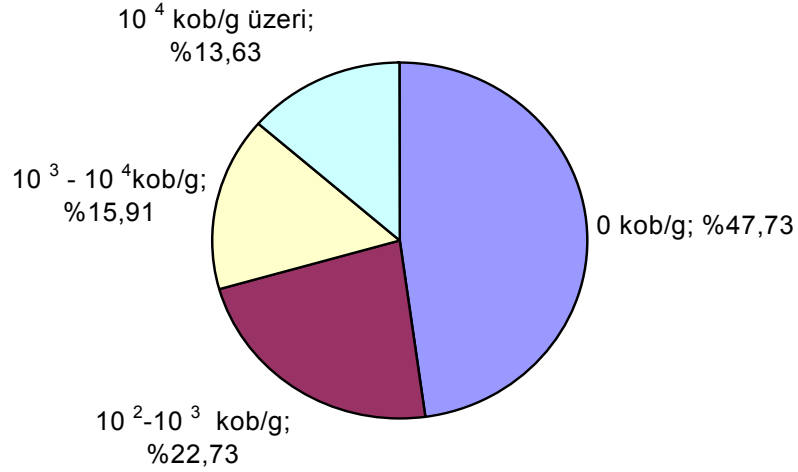
### 4.2.1. Kahve örneklerinde koliform bakterilerin varlığı

Kahve örneklerinin koliform bakteri yükü incelenmiştir. Buna göre kahve örneklerinin % 47,73'ünde koliform bakteri bulunmazken % 22,73'ünde  $10^2$  ile  $10^3$  kob/g arasında, %15,91'inde ise  $10^3$  ile  $10^4$  kob/g 'ın arasında, %13,63'ünde  $10^4$  kob/g üzerinde koliform bakteri tespit edilmiştir. Koliform bakteri tespit edilen tüm örneklerin koliform miktarları Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde çözünebilir, çekilmiş filtre kahveler için tavsiye edilen değer olan 9 kob/g'ın üzerinde çıkmıştır. Kahve örneklerinde tespit edilen koliform bakteri miktarları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kahve örneklerinin toplam koliform bakteri miktarları (kob/g)

Örnek No	Toplam koliform (kob/g)	Örnek No	Toplam koliform (kob/g)
1	-	23	$10^2$
2	-	24	-
3	-	25	-
4	-	26	$10^2$
5	-	27	-
6	-	28	$10^2$
7	-	29	-
8	-	30	$4 \times 10^4$
9	-	31	102
10	-	32	-
11	$2,1 \times 10^3$	33	-
12	$8 \times 10^3$	34	-
13	$5,3 \times 10^3$	35	$5,6 \times 10^4$
14	$4,6 \times 10^3$	36	$1,5 \times 10^4$
15	$3,5 \times 10^3$	37	$2,6 \times 10^4$
16	$2,3 \times 10^3$	38	104
17	$2 \cdot 10^2$	39	$1,5 \times 10^4$
18	$5 \cdot 10^2$	40	$3 \times 10^2$
19	-	41	-
20	$2,6 \times 10^3$	42	$10^2$
21	$10^2$	43	-
22	$10^2$	44	-
<b>Minimum</b>			-
<b>Maksimum</b>			$5,6 \times 10^4$
<b>Ortalama</b>			$4,366 \times 10^3$

Koliform bakteri miktarlarına göre kahve örneklerinin dağılımı Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Koliform bakteri miktarlarına göre kahve örneklerinin dağılımı

Kahve örneklerinin toplam koliform düzeylerinin farklılıklarını belirlemek için sonuçların logaritmaları alınmış ve varyans analizi yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kahve örneklerinin toplam koliform bakteri düzeylerine ait varyans analiz sonuçları.

Varyans Analiz Tablosu	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri
<b>Muamele</b>	43	262,49	6,1040	468,9
<b>Hata</b>	44	0,5728	0,0130	
<b>Genel</b>	87	263,069		

\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Varyans analiz sonuçlarına göre örnekler arasındaki farklılıklar  $p < 0,01$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Önemli bulunan örneklere Duncan testi uygulanmıştır.

Örneklerin 7 adedi  $10^3$  ile  $10^4$  kob/g'ın arasında, 10 adedi  $10^2$  -  $10^3$  kob/g arasında koliform bakteri yüküne sahipken, 6 adedinde tespit edilen koliform bakteri miktarı,  $10^4$  kob/g'ın üzerinde çıkmıştır. Kahve örneklerinden 21 adedinde koliform bakteri tespit edilmemiştir.

Koliform bakteriler insan ve sıcak kanlı hayvanların bağırsak sistemlerinde doğal olarak bulunduğundan başlangıçta fekal kontaminasyonun en önemli indikatörü olarak değerlendirilmişlerdir. Ancak gıdalarda koliform bakterilerin varlığının ortaya konması fekal kontaminasyon veya enterik patojen varlığının kesin bir göstergesi değildir. Çünkü koliform bakteriler insan ve hayvan bağırsak sistemi dışındaki bir çok ortamda da yaygın olarak bulunmakta ve bu ortamlarda uygun koşullarda çok iyi gelişip üreyebilmektedirler (Ünlütürk ve Turantaş, 1999). Koliform bakterilerin doğada yaygın olarak bulunması, insan ve hayvan vücudu dışında üreyebilmesi ve bazı suşlarının fekal kaynaklı olmayışı gibi nedenlerden dolayı bu grubun kahvede varlığı daha çok üretimin hijyen ve sanitasyonun gerektirdiği koşullarda yapılmadığının göstergesidir.

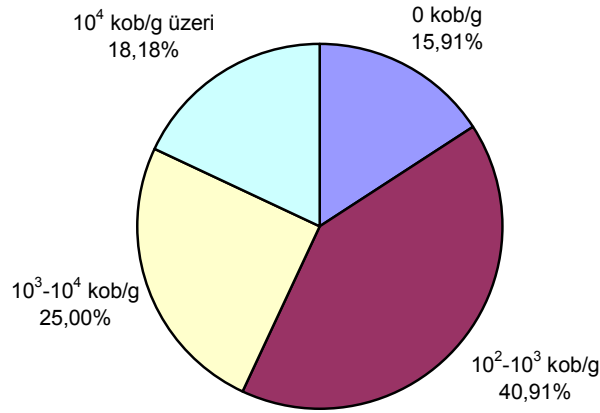
#### **4.2.2. Kahve örneklerinin toplam mezofil canlı bakteri sayıları**

Kahve örneklerinin toplam mezofil canlı bakteri yükü incelenmiştir. Buna göre kahve örneklerinin % 15,91'inde toplam mezofil canlı bakteri tespit edilemezken, % 40,91'inde  $10^2$  ile  $10^3$  arasında, % 25'inde  $10^3$  ile  $10^4$  arasında, %18,18'inde ise  $10^4$  'ün üzerinde toplam mezofil canlı bakteri tespit edilmiştir. Kahve örneklerinde tespit edilen toplam mezofil canlı bakteri miktarları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Kahve örneklerinin toplam mezofil canlı bakteri miktarları (kob/g)

Örnek No	Toplam Mezofil Canlı Bakteri (kob/g)	Örnek No	Toplam Mezofil Canlı Bakteri (kob/g)
1	$2,4 \times 10^4$	23	$6 \times 10^2$
2	$3 \times 10^2$	24	$1 \times 10^2$
3	-	25	$2 \times 10^2$
4	102	26	103
5	$10^2$	27	-
6	-	28	$10^3$
7	$10^2$	29	$3 \times 10^2$
8	-	30	$6,5 \times 10^4$
9	$1,2 \times 10^3$	31	$2 \times 10^2$
10	-	32	$5 \times 10^2$
11	$2,6 \times 10^3$	33	$2 \times 10^2$
12	104	34	-
13	$6,6 \times 10^3$	35	$8 \times 10^5$
14	$5 \times 10^3$	36	$6 \times 10^5$
15	$5,7 \times 10^3$	37	106
16	$2,4 \times 10^3$	38	$4 \times 10^5$
17	$6 \times 10^2$	39	$2,8 \times 10^4$
18	$7 \times 10^2$	40	$4,5 \times 10^3$
19	-	41	$2,3 \times 10^3$
20	$3 \times 10^3$	42	$3 \times 10^2$
21	$10^2$	43	$3 \times 10^2$
22	$10^2$	44	$3 \times 10^2$
<b>Minimum</b>			-
<b>Maksimum</b>			$10^6$
<b>Ortalama</b>			$6,74 \times 10^4$

Toplam mezofil canlı miktarlarına göre kahve örneklerinin dağılımı Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Toplam mezofil canlı miktarlarına göre kahve örneklerinin dağılımı

Kahve örneklerinin toplam mezofil canlı düzeylerinin farklılıklarını belirlemek için varyans analizi yapılmış sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Kahve örneklerinin toplam mezofil canlı düzeylerine ait varyans analiz sonuçları.

Varyans Analiz Tablosu	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri
Muamele	43	223,87	5,2060	254,5
Hata	44	0,9	0,0200	
Genel	87	224,77		

\* p<0,01 düzeyinde önemli

Varyans analiz sonuçlarına göre örnekler arasındaki farklılıklar p<0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Önemli bulunan örneklere Duncan testi uygulanmıştır.

Örneklerin 11 adedi  $10^3$  ile  $10^4$  kob/g'ın arasında, 18 adedi  $10^2$  -  $10^3$  kob/g arasında toplam mezofil canlı yüküne sahipken, 8 adedinde tespit edilen toplam mezofil canlı miktarı,  $10^4$  kob/g'ın üzerinde çıkmıştır. Kahve örneklerinin 7 adedinde toplam mezofil canlı tespit edilmemiştir.

#### **4.2.3. Kahve örneklerinin küf sayıları**

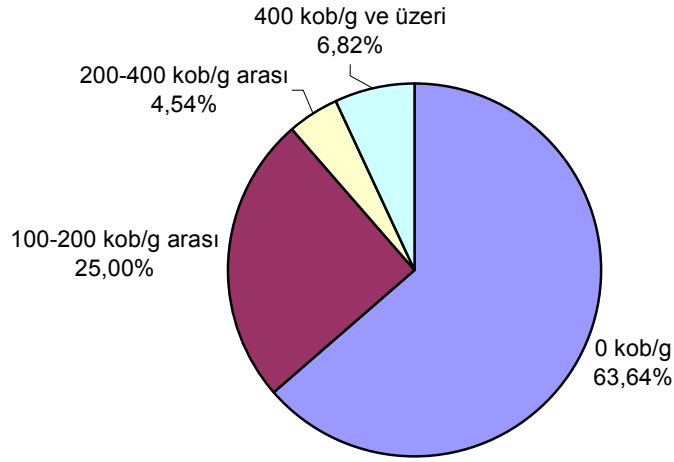
Kahve örneklerinin küf yükü incelenmiştir. Buna göre kahve örneklerinin % 63,64'ünde küf bulunmazken % 25'inde  $10^2$  ile  $2 \times 10^2$  arasında, %4,54'ünde  $2 \times 10^2$ - $4 \times 10^2$  arasında, %6,82'sinde ise  $4 \times 10^2$  ve üzerinde küf tespit edilmiştir. Küf tespit edilen örneklerin %11,36'sının küf miktarları, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde çözünebilir, çekilmiş filtre kahveler için tavsiye edilen sınırın ( $10^2$  kob/g), üzerinde çıkmıştır.

Kahve örneklerinde tespit edilen küf miktarları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Kahve örneklerinin küf miktarları (kob/g)

Örnek No	Küf	Örnek No	Küf
1	$4 \times 10^2$	23	$10^2$
2	-	24	$10^2$
3	-	25	-
4	$5 \times 10^2$	26	$10^2$
5	-	27	-
6	-	28	-
7	-	29	-
8	-	30	$10^2$
9	$10^2$	31	-
10	$10^2$	32	-
11	$10^2$	33	-
12	-	34	$10^2$
13	-	35	$10^2$
14	-	36	-
15	$10^2$	37	-
16	$2 \times 10^2$	38	$9 \times 10^2$
17	-	39	-
18	-	40	-
19	-	41	-
20	$3 \times 10^2$	42	$10^2$
21	-	43	-
22	-	44	-
<b>Minimum</b>			-
<b>Maksimum</b>			$9 \cdot 10^2$
<b>Ortalama</b>			$7,72 \times 10^1$

Küf miktarlarına göre kahve örneklerinin dağılımı Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Küf miktarlarına göre kahve örneklerinin dağılımı

Kahve örneklerinin küf miktarlarının farklılıklarını belirlemek için varyans analizi yapılmış sonuçlar Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Kahve örneklerinin küf düzeylerine ait varyans analiz sonuçları.

Varyans Analiz Tablosu	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri
Muamele	43	100,608	2,3400	116,5
Hata	44	0,88	0,0200	
Genel	87	101,49		

\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Varyans analiz sonuçlarına göre örnekler arasındaki farklılıklar  $p < 0,01$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Önemli bulunan örneklere Duncan testi uygulanmıştır.

Örneklerin 2 adedi  $2 \times 10^2$  ile  $4 \times 10^2$  kob/g arasında, 11 adedi  $10^2$ -  $2 \times 10^2$  kob/g arasında küf yüküne sahipken, 3 adedinde tespit edilen küf miktarı,  $4 \times 10^2$  kob/g ve üzerinde bulunmuştur. Kahve örneklerinden 28 adedinde küf tespit edilmemiştir.

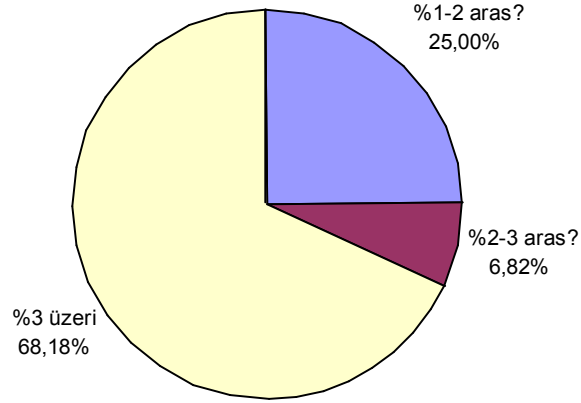
#### 4.3. Kahve örneklerinin % nem miktarı

Kahve örneklerinin içeriğindeki % nem miktarları araştırılmıştır. Buna göre kahve örneklerinin % 25'inde nem oranı %1 – 2 arasında bulunmuşken, %6,82'sinde %2 – 3 arasında, %68,18'inde ise nem oranı , Kahve (Çiğ Çekirdek ve Öğütülmüş) Standardı'na göre tavsiye edilen değer olan %3'ün üzerinde tespit edilmiştir. Kahve örneklerinde tespit edilen %nem miktarları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Kahve örneklerinde bulunan % nem oranları

Örnek No	% nem miktarı	Örnek No	% nem miktarı
1	5,33	23	5,77
2	1,52	24	4,31
3	4,31	25	4,66
4	2,4	26	4,42
5	4,28	27	5,56
6	3,77	28	4,96
7	1,78	29	3,56
8	3,14	30	5,45
9	4,4	31	1,84
10	4,47	32	3,06
11	4,72	33	4,36
12	4,55	34	5,63
13	3,88	35	3,86
14	1,44	36	1,6
15	5,17	37	3,66
16	4,88	38	1,82
17	4,95	39	5,87
18	2,66	40	1,04
19	4,26	41	1,56
20	1,22	42	2,42
21	1,36	43	4,62
22	1,82	44	4,52
<b>Minimum</b>			<b>1,04</b>
<b>Maksimum</b>			<b>5,87</b>
<b>Ortalama</b>			<b>3,65</b>

% Nem miktarlarına göre kahve örneklerinin dağılımı Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. % Nem miktarlarına göre kahve örneklerinin dağılımı

Kahve örneklerinin nem oranlarındaki farklılıklarını belirlemek için varyans analizi yapılmış sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Kahve örneklerinin nem oranlarına ait varyans analiz sonuçları.

Varyans Analiz Tablosu	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri
Muamele	43	186,267	4,3320	5415,0
Hata	44	0,035	0,0010	
Genel	87	186,302		

\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Varyans analiz sonuçlarına göre örnekler arasındaki farklılıklar  $p < 0,01$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Önemli bulunan örneklere Duncan testi uygulanmıştır.

Kahve örneklerinin 11 adedi %1 – 2, 3 adedi %2 - %3 arasında nem oranına sahipken, 30 adedinde tespit edilen nem oranı %3'ün üzerinde çıkmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan Türk kahvesi örneklerinde Elisa yöntemi kullanılarak OTA miktarının belirlenmesinin yanında E.coli, toplam koliform, küf, maya, toplam mezofil canlı miktarları araştırılarak örneklerin mikrobiyolojik yükü belirlenmiş, nem miktarları da incelenerek standartlara uygunluğuna bakılmıştır. Araştırma Türkiye'de kahvenin durumunu ortaya koymak üzere yapılmıştır. İki tekerrürlü olarak yapılan çalışmada örneklerin OTA miktarları yüksek düzeylerde bulunmamıştır. Türkiye'de 2002'de yayınlanan Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ'de işlenmemiş tahıl tanelerinde, tahıl ürünlerinde ve kuru üzümde OTA sınırları belirlenmesine rağmen henüz kahvede böyle bir sınırlama mevcut değildir. Örneklerin OTA miktarları 0-2,6 ppb arasında değişiklik göstermiştir. Bu sonuçlar, ulusal düzeyde kahvede OTA limitlerini belirleyen ülkelerin sınırlarının altındadır.

Türkiye'ye kahve, kurutulmuş olarak gelmektedir. Kavurma ve öğütme işlemleri Türkiye'de gerçekleştirilmektedir. Kavurma işleminin kahvede etkisini belirlemek üzere yapılan çalışmalarda kavurmanın OTA miktarını farklı oranlarda azalttığı belirlenmiştir. Fakat çekirdeklerin OTA miktarı önemlidir. Türkiye'de kahvede OTA sınırlandırılmasının olmayışı burada önem arz etmektedir.

Çalışma sonucunda örneklerin hiç birinde E.coli tespit edilmemesine karşın koliform bakteri tespit edilen tüm örnekler Türk Gıda Kodeksi'nde tavsiye edilen değerin üzerinde bulunmuştur. Örneklerin 21 adedinde koliform bakteri, 7 adedinde toplam mezofil canlı tespit edilememiştir. Örneklerde *E.coli* tespit edilmemesi, ürünlere fekal bir bulaşma olmadığını, koliform grubunun örneklerin %52,27'sinde tavsiye limitlerinin üzerinde bulunması ve tespit edilen örneklerde toplam mezofil canlı miktarlarının yüksek olması, hijyen ve sanitasyon kurallarına uygun olarak üretim yapılmadığının göstergesidir.

Kavrulmuş ve öğütölmüş kahvelerde, kontrollü depolama koşulları sağlanarak ve çekirdeklere etkin kavurma işlemleri uygulanarak küf gelişimi ve OTA üretimi kontrol altına alınmalıdır.

## 6. KAYNAKLAR

**ANONYMOUS, 1978.** Türk Standartları Enstitüsü, TS 3117 UDK 633.73:543.81

**ANONYMOUS, 2002b.** Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ, T. C. Resmi Gazete, No: 24885

**ANONYMOUS, 2004.** Ochratoxin A: barrier levels for coffee and grape juice, Related News and Analyses.

**ANONYMOUS, 2005.** OTA risk management: Guidelines for green coffee buying .  
<http://www.ecf-coffee.org/publications.html>

**ANONYMOUS, 2006 a.** <http://www.fao.org/>

**ANONYMOUS, 2006 b.** Ridascreen Ochratoksin A. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Ochrotoxin A. r-Biopharm GmbH, Germany.

**BATISTA, L.R., CHALFOUN, S.M., PRADO, G., SCHWAN, R.F., WHEALS, A.E., 2002.** Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). International journal of Food Microbiol. 85: 293-300.

**BAUMGART, J., 1993.** Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Hamburg.

**BAYMAN, P., BAKER, J., DOSTER, M., MICHAILIDES, T., MAHONEY, N., 2002.** Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2326 – 2329.

**BRESCH, H., URBANEK, M., HELL, K., 2000.** Ochratoxin A in coffee, tea and beer. Archiv für Lebensmittelhygiene 51: 89-94 (Alınmıştır: Bucheli ve Taniwaki, 2002).

**BUCHELI, P., TANIWAKI, M.H., 2002.** Review Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. Food Addit. Contam. 7: 655 – 665.

**CABRERA, H., TANIWAKI, M., MENEZES, H., IAMANAKA, B. 2004.** The production of Ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. Food Control 15: 531-535.

**CANTAFORA, A., GROSSI, M., MIRAGLIA, M., BENELLI, L., 1983.** Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. La Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione 12: 103-108 (Alınmıştır: Batista ve ark., 2003).

**CIEGLER, A. 1972.** Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of *Aspergillus ochraceus* group. Can. J. Microbiol. 18: 631-636 (Alınmıştır: Taniwaki ve ark., 2003).

**CHOURASIA, H., K., 1995.** Mycobiota and mycotoxins in herbal drugs of Indian pharmaceutical industries. Mycol. Res. 99: 697-703 (Alınmıştır: Taniwaki ve ark., 2003).

**CREPPY, E., 2002.** Update of survey regulation and toxic effects of micotoxins in Europe. Toxicology Letters 127: 19 – 28.

**ÇAĞLARIRMAK, N., 1994.** Öğütülmüş kahvenin kimyasal bileşimi, bazı tahıl ve baklagil ilavesinin kalite, protein fraksiyonları ve özelliklerin etkileri üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D. doktora tezi, İzmir.

**FRANK, M., 1999.** Mycotoxin prevention and decontamination. In: Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, Tunisia, 3-6 March (Alınmıştır: Pardo ve ark., 2004a).

**GAREIS, M., REUBEL, G., KRONING, T., PORZIG, R., 1987.** A case of infectious fading puppy syndrome in Afghan puppies associated with feeding of milk powder containing ochratoxin A. Tierärztliche Umschau 42: 77–80 (Alınmıştır: Garip, 2000).

**GARİP, İ., 2000.** Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan biralık arpa, malt ve birada Ochratoxin A düzeylerinin belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Doktora Tezi, Konya.

**GILBERT, J., ANKLAM, E., 2002.** Validation of analytical methods for determining microtoxins in foodstuffs. Trends in Analytical Chemistry 21: 6 – 7.

**GÜMÜŞ, T., 2002.** Arpa, malt ve birada okratoksin A (OTA) varlığı ve bira üretimi sırasında Ota'nın maya tarafından parçalanması, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D. Doktora tezi, Edirne.

**HEENAN, C., N., SHAW, K., J., PITT, J., I., 1998.** Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. Food Mycol. 1: 63 –72 (Alınmıştır: Taniwaki ve ark., 2003).

**HEILMANN, W., REHFELDT, A., ROTZOLL, F., 1999.** Behavior and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. Eur. Food Res. Technol. 209: 297 – 300.

**HÖHLER, D., 1998.** Ochratoxin A in food and feed occurrence, legislation and mode of action. Ernährungswiss 37: 2- 12.

**JOOSTEN, J., GOETZ, J., PITTET, A., SCHELLENBERG, M., BUCHELI, P., 2001.** Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries, Food Microbiol. 65: 39 - 44.

**JOSEFSON, B., MOLLER, T., 1980.** Heat stability of ochratoxin A in pig products. J. Sci. Food Agric. 31: 1313 – 1315 (Alınmıştır Garip, 2000).

**KAP PAZARBAŞI, S., 2002.** Çekirdeksiz üzümelerde Okratoksin A üreticisi küflerin dağılımı üzerinde nem ve sıcaklığın etkilerinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D., Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

**KARAGÖZLÜ, N., KARAPINAR, M., 1998.** Bazı tahıl ve ürünlerinde Okratoksin A ve fungal kontaminasyon. Turk J. Biol. 24: 561 – 572.

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

**KİREMİT, N., 1993.** *Aspergillus mellus* tarafından üretilen okratoksin A üretimini etkileyen fizyolojik koşulların saptanması. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D., Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara.

**KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M. 1989.** Risk assesment of the mycotoxin ochratoxin A. Environ. Sci. 2:179-248 (Alınmıştır Gümüş, 2002).

**LARSEN, T., SVENDSEN, A., SMEDSGAARD, J., 2001.** Biochemical characterization of ochratoxin A- Producing strains of genus *Penicillium* , Appl. Environ. Microb. 67: 3630 - 3635.

**LEONI, L., SOARES, L., OLIVEIRA, P., 2000.** Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. Food Addit. Contam. 17: 867 – 870.

**LEVI, C., P., TRENK, H., L., MOHR, H., K., 1974.** Study of the occurence of ochratoxin A in green coffee beans, Journal of the Associaion of Official Analytical Chemists, 57, 866 – 870 (Alınmıştır: Bucheli ve Taniwaki, 2002).

**LOBEAU, M., SAEGER, S., SİBANDA, L., VETRO, I., PETEGHEM, C., 2005.** Development of new clean up tandem assay column fort he deection of ochratoxin A in roasted coffee. Analytica Chimica Acta 538: 57 – 61.

**MANTLE, P., 2000.** Uptake of radiolabelled ochratoxin A from soil by coffee plants. Phytochemistry 53: 377 – 378.

**MARTINS, M.L., MARTINS, H.M., GIMENO, A., 2002.** Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). Food Addit. Contam. 20: 1127- 1131.

**MICCO, M., GROSSI, M., MIRAGLIA, M., BRERA, C., 1989.** A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. Food Addit. Contam. 6: 333-339 (Alınmıştır: Batista ve ark., 2003).

**MISLIVEC, P., B., BRECE, V., R., GIBSON, R., 1983.** Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. Food Protection 46: 969-973 (Alınmıştır: Pardo ve ark., 2004a).

**NAKAJİMA, M., TSUBOUCHİ, H., MİYABE, M., UENO, Y., 1997.** Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. Food and Agricultural Immunology 9: 77-83 (Alınmıştır: Batista ve ark., 2003).

**PARDO, E., MARIN, S., SOLSONA, A., SANCHIS, V., RAMOS, A.J., 2004a.** Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. Food Microbiol. 21: 267-274.

**PARDO, E., MARIN, S., RAMOS, A., SANCHIS, V., 2004b.** Occurrence of Ochratoxigenic fungi and Ochratoxin A in green coffee from different origins, Food Sci. Tech. Int. 10: 0045 – 5.

**PATEL, S., HAZEL, C., M., WINTERTON, A., G., M., GLEADLE, A., E., 1997.** Survey of the ochratoxin A in UK retail coffees, Food Addit. Contam. 3: 217-222 (Alınmıştır: Vega ve Mercaider, 1998).

**PATTERSON, D., 1977.** Metabolism of aflatoxin and other mycotoxin in relation to their toxicity and accumulation of residues in animal tissues. Pure Appl. Chem. 49: 1723 – 1731 (Alınmıştır Garip, 2000).

**PITT, J., I., CHRISTIAN, J., H., B., 1968.** Water relations of xrophilic fungi isolated from prunes. Appl. Microbiol. 16, 1853 – 1858 (Alınmıştır: Pardo ve ark., 2004b).

**PITT, J., I., TANIWAKI, M., H., TEIXEIRA, A., A., IAMANAKA, B., T., 2001.** Distribution of *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, and *A. carbonarius* in coffee in four regions of Brazil. 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 14-18 May (Alınmıştır: Bucheli ve Taniwaki, 2002).

**QUIROZ, M., RIOS, O., BAREL, M., GUYOT, B., GUIRAUD, J., GALINDO, S., 2004.** Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. *Food Microbiol.* 21: 629-634.

**RINGOT, D., LERZY, B., BONHOURE, J., AUCLAIR, E., ORIOL, E., LARONDELLE, Y., 2005.** Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochemistry* 40: 3008-3016.

**ROMANI, S., SACCHETTI, G., LOPEZ, C., C., PINNAVAIA, G., G., ROSA, M., D., 2000.** Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. *Agricultural Food Chemistry* 48: 3616-3619 (Alınmıştır: Batista ve ark., 2003).

**SCOTT, P.M., 1984.** Effects of food processing on mycotoxins. *J. Food Protection* 47: 489 – 499 (Alınmıştır Garip, 2000).

**SCOTT, P.M., 1993.** Mycotoxins. *J. Assoc. Of. Anal. Chemistry.* 76: 112-119 (Alınmıştır Gümüş, 2002).

**SCOTT, P., M., 1996.** Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 13: 19-21.

**SOLIMAN, K., 2002.** Incidence, level and behavior of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7477 – 7481.

**SOMMERFELD, G., GABEL, B., 2002.** Studies on the sample weight for ochratoxin A determination in raw coffee. Eur. Food Technol. 215: 520-522.

**SOYSAL, M.İ., 1998.** Biyometrinin Prensipleri. İstatistik 1 ve 2 ders notları, Trakya Üniversitesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi, Yayın No. 95, Ders Notu. 64, Tekirdağ.

**STUDER-ROHR, I., DIETRICH, D., R., SCHLATTER, J., SCHLATTER, C., 1994.** Ochratoxin A and coffee. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 85: 719-729 (Alınmıştır: Bucheli ve Taniwaki, 2002).

**TANIWAKI, M.H., PITT, J.I., TEIXEIRA, A.A., IAMANAKA, B.T., 2002.** The source of ochratoxinA in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. Food Microbiology 82: 173 – 179.

**TARIN, A., ROSELL, M., GUARDINO, X., 2004.** Use of high performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins: aflatoxins and ochratoxin A. Chromatography A 1047: 235 - 240.

**TEIXEIRA, A., A., TANIWAKI, M., H., PITT, J., I., IAMANAKA, B., T., MARTINS, C., P., 2001.** The presence of ochratoxin A in coffee due to local conditions and processing in four regions of Brazil. 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 14-18 May (Alınmıştır: Bucheli ve Taniwaki, 2002).

**TOMOVA, S., 1977.** Stability of ochratoxin A in foods. Zhig. Zdraveopaz. 20: 266 – 270 (Alınmıştır Garip, 2000).

**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. AOAC International 82: 85-89

**TSUBOUCHI, H., YAMAMOTO, K., HISADA, K., SAKABE, A., 1985.** A survey of occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in important green coffee beans. Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology 19: 16-21 (Alınmıştır: Batista ve ark., 2003).

**TSUBOUCHI, H., YAMAMOTO, K., HISADA, K., SAKABE, A., SCHLATTER, C., 1987.** Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. Mycopathologia 97: 111-115 (Alınmıştır: Martins ve ark., 2003).

**URBANO, G., R., TANIWAKI, M., H., LEITAO, F., M., F., VINCENTINI, M., C., 2001.** Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. Food Protection 64: 1226-1230 (Alınmıştır: Pardo ve ark., 2004a).

**ÜNLÜTÜRK, A., TURANTAŞ, F., 1999.** Gıda Mikrobiyolojisi. Ege Üniversitesi, İzmir.

**VARGA, J., RIGO, K., TEREN, J., 2000.** Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. Food Microbiol. 59: 1- 7.

**VEGA, F., MERCAIDER, G., 1998.** Insects, coffee and ochratoxin A. Florida Entomologist 81: 4-5.

**VIANI, R., 2002.** Effect of Processing on Ochratoxin A (OTA) content of coffee. Association Scientifique Internationale du Cafe (ASIC), Switzerland, Mycotoxins and Food Safety, Kluwer Academic/Plenum Publishers.

**ZIMMERLI, B., DICK, R. 1996.** Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. Food Addit. Contam. 13:655-668 (Alınmıştır: Gümüş, 2002).