

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAHVEDE OKRATOKSİN A DÜZEYLERİNİN
İMMUNO-ENZİMATİK VE KROMATOĞRAFİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Betül AKÇAGEDİK**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN**

**Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2011
KAYSERİ**

**T. C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAHVEDE OKRATOKSİN A DÜZEYLERİNİN
İMMUNO-ENZİMATİK VE KROMATOĞRAFİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Betül AKÇAGEDİK**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN**

**Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
EÜBAP-TSY-09-829 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2011
KAYSERİ**

Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN danışmanlığında **Betül AKÇAGEDİK** tarafından hazırlanan “**Kahvede Okratoksin A Düzeyinin İmmuno-Enzimatik ve Kromatografik Yöntemlerle Araştırılması**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

14 /01/2011

JÜRİ

Başkan : Prof.Dr Bilal Cem LİMAN
Üye : Doç. Dr. Gökhan ERASLAN
Üye : Doç. Dr. Murat KANBUR

İmza

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /..... /.....

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında, başlangıcından sonuna kadar, tezimin her aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine; yine tezin deneysel ve laboratuvar çalışmaları kısmında önemli katkıları olan ve tezin çalışılması için Anabilim Dalının tüm olanaklarını kullanıma sunan Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN'a; çalışma süresince yardımları için Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri yönetimi ve çalışanlarına, ayrıca Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine EÜBAP-TSY-09-829 no'lu proje ile sağladıkları maddi destek için teşekkürler ederim.

KAHVEDE OKRATOKSİN A DÜZEYLERİNİN İMMUNO-ENZİMATİK VE KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Okratoksin A *Aspergillus* türü mantarlar tarafından sentezlenen ve tahıllar, çay ve kahve (özellikle *A. carbonarius* ve *A. niger*) gibi ürünlerde doğal kirletici olarak bulunan mikotoksinlerdir. Okratoksinler nefrotoksik, hepatotoksik, teratojenik, karsinojenik ve immunosupresif etkilerinden dolayı toplum sağlığı açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmada Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde tüketime sunulan 90 adet kahve örneğinde okratoksin A kalıntılarının immuno-enzimatik (EIA) ve kromatografik (HPLC) yöntemle belirlenmesi amaçlandı.

EIA yöntemine göre, örneklerin 20'sinde (% 22,22) okratoksin A kalıntısı tespit edildi. Ortalama okratoksin A yoğunluğu $0,032 \pm 0,015$ ppb, en düşük ve en yüksek okratoksin A düzeyi sırasıyla 0,009 ve 0,053 ppb olarak belirlendi.

HPLC yöntemine göre örneklerin 19'unda okratoksin A kalıntısı tespit edildi, okratoksin A düzeyi ortalaması $0,025 \pm 0,016$ ppb; en düşük ve en yüksek okratoksin A düzeyi sırasıyla 0,009 ve 0,073 ppb olarak ölçüldü.

Numunelerde her iki yöntemle belirlenen okratoksin A düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmedi ($P > 0,05$).

Sonuç olarak, analiz edilen kahve numunelerindeki okratoksin A düzeylerinin Türk Gıda Kodeksinde belirtilen limitin (5,0 ppb) oldukça altında seğrettiği belirlendi. Kahve örneklerinde saptanan okratoksin A değerlerinin tüketici sağlığı yönünden risk taşımadığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kahve, Okratoksin A, HPLC, EIA

INVESTIGATION OF OCHRATOXIN A RESIDUES IN COFFEE MEASURED BY IMMUNOENZYMATIC AND CHROMATOGRAPHIC METHODS

ABSTRACT

Ochratoxin A is mycotoxins synthesized by *Aspergillus* species, found in cereals, tea and coffee (*especially A. carbonarius* ve *A. niger*) products as naturally contaminants. Ochratoxins have nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic, carcinogenic and immunosuppressive effects, therefore they are critically important for public health.

In this study, it was aimed to determine the ochratoxin A levels with high performance liquid chromatography (HPLC) and enzyme immune assay (EIA) in sample of 90 coffee consumed in the distinct province of Turkey.

According to EIA technique, ochratoxin A was found twenty of the total coffee samples (22.22%). The average level of ochratoxin A level was found to be 0.032 ± 0.015 ppb, the lowest and the highest level of ochratoxin A was 0.009 and 0.053 ppb, respectively.

According to HPLC technique, ochratoxin A was found nineteen of the total coffee samples. The average level of ochratoxin A level was found to be 0.025 ± 0.016 ppb, the lowest and the highest level of ochratoxin A was 0.009 and 0.073 ppb, respectively.

Statistically significant was not determined to exist between the ELISA and HPLC methods in the ochratoxin A residue of coffee samples ($P > 0.05$).

As a result, levels of ochratoxin A analyzed coffee samples were below the limit of Turkish Food Codex (5.0 ppb). And also, it has concluded that ochratoxin A levels of coffee samples do not carry risk for consumer health.

Key words: Coffee, Ochratoxin A, HPLC, EIA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR	VIII
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2. 1 OKRATOKSİN A	5
2. 1. 1. Özellikleri ve Kaynakları	5
2. 1. 2. Toksikokinetik	8
2. 1. 2. 1. Emilme	8
2. 1. 2. 2. Dağılım	8
2. 1. 2. 3. Metabolizma	9
2. 1. 2. 4. Eliminasyon	10
2. 1. 3. Etki Şekli	13
2. 1. 4. Zehirliliği ve Etkileri	13
2. 1. 5. Tanı	17
2. 1. 6. Korunma ve Sağaltım	18
2. 1. 7. Ülkemizde ve Diğer Ülkelerdeki Yasal Düzenlemeler	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3. 1. KULLANILAN CİHAZ, GEREÇ VE KİMYASALLAR	23
3. 1. 1. Cihaz ve Gereçler	23
3. 1. 2. Kimyasallar	24

	<u>Sayfa No</u>
3. 2. YÖNTEM.....	24
3. 2. 1. Analiz Materyali.....	24
3. 2. 2. Kahve Numunelerinin Analize Hazır Hale Getirilmesi	24
3. 2. 3. EIA Analiz Yöntemi	25
3. 2. 4. Standart Eğrisinin Hazırlanmasında Kullanılan Yoğunluklar	26
3. 2. 5. Okratoksin A Tayini İçin HPLC Cihaz ve Analiz Koşulları	26
3. 2. 6. İstatistiksel Analiz... ..	27
4. BULGULAR	28
4. 1. OKRATOKSİN A’NIN EIA ANALİZ BULGULARI.....	28
4. 2. OKRATOKSİN A’NIN HPLC ANALİZ BULGULARI	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
6. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

OTA	:	Okratoksin A
dk	:	Dakika
g	:	Gram
kg	:	Kilogram
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
ng	:	Nanogram
°C	:	Santigrad derece
ppb	:	Milyarda bir kısım, µg/kg
TS	:	Türk standardı
UV	:	Ultraviole
%	:	Yüzde
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
v	:	Hacim

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. İnsan ve hayvanlarda okratoksin A'nın tek doz ağızdan verilmesi sonucunda kinetik parametreler.....	11
Tablo 2.2. İnsan ve hayvanlarda okratoksin A'nın tek doz damar içi verilmesi sonucunda kinetik parametreler.....	12
Tablo 2.3. Farklı bitkisel ürünlerde karşılaşılan okratoksin ile diğer mikotoksin kombinasyonları.....	15
Tablo 2.4. Okratoksin A'nın sitokinler üzerine etkileri.....	17
Tablo 2.5. Okratoksin A analizlerinin temizleme ve ekstraksiyon aşamasında kullanılan katı faz ekstraksiyon, ayırma ve tespit metotları.....	18
Tablo 2.6. Farklı yıllarda insan kan örneklerinde okratoksin A varlığı.....	21
Tablo 2.7. Okratoksin A için kahvelerde farklı ülkelerin tolerans düzeyleri (ppb).....	22
Tablo 3. 1. EIA Standart Değerler.....	26
Tablo 4. 1. Kahve örneklerindeki EIA yöntemine göre okratoksin A düzeyleri.....	29
Tablo 4.2. EIA ile ölçülmüş kahve örneklerindeki okratoksin A düzeyleri.....	31
Tablo 4. 3. HPLC yöntemine göre kahve örneklerindeki okratoksin A düzeyleri.....	32
Tablo 4.4. HPLC ile ölçülmüş kahve örneklerindeki okratoksin A düzeyleri.....	33
Tablo 4.5. EIA ve HPLC ile ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması.....	34
Şekil 2.1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı ve bazı metabolitleri.....	6
Şekil 2.2. Okratoksin A'nın biyolojik olarak sentez aşamaları.....	7
Şekil 2.3. okratoksin A'nın metabolizması.....	10
Şekil 2.4. Okratoksinin bağışıklık sistemi üzerine etkileri.....	16
Şekil 3.1. Okratoksin A standardının kromatogramı.....	27

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gıda ürünlerinde muhtemel bulunabilecek bakteri, pestisit, kimyasal ve mikotoksin gibi kirleticiler gıda zehirlenmelerinin en önde gelen sebepleridir; günümüzde bu suretle de ciddi ekonomik kayıplar ve sağlık problemleri ile karşı karşıya kalınmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ve toplumlarda bu olgulara fazlasıyla önem verilmekte ve bu olumsuzlukların önüne geçebilmek için her geçen yıl daha ciddi adımlar atılmaktadır. Günümüze kadar bilinen gıda kirleticileri arasında yer alan mikotoksinler içinde tanımlanan aflatoksinler, fumonisinler, trikotesenler, zearalenon ve okratoksinler canlılardaki ciddi bazı patolojik bozuklukların sorumlularındandır (1).

1800 yıllarının sonu ve 1900 yıllarının başında mantarların hem sıvı hem de katı ortamdaki fermentasyonu sonucu ikincil metabolit ürettikleri biliniyordu. 1940 ve 1950'li yıllar arasında İkinci Dünya Savaşının başlarında bozuk ve kalitesiz gıda tüketimi ile ilişkili "Alimenter Toksik Aleuka" isimli bir hastalık tanımlanmıştır. Modern mikotoksikolojinin ilk adımları 1961 yılında atılmıştır. Böylece bazı disiplinler (analitik kimya, mikrobiyoloji, zirraat mühendisliği, genetik, veteriner ve tıp) bir araya gelerek birçok yeni mikotoksin keşfetmişlerdir (2).

Mikotoksinler, mantarların ikincil metabolitleri olmakla birlikte bu metabolitlerin mantarların gelişimi ve üremesi üzerine etkisi yoktur. Bu bileşikler düşük molekül

ağırlığına sahiptir ve kimyasal yapıları ile biyolojik özellikleri farklılık gösterir. *Fusarium*, *Pencillium* ve *Aspergillus* hayvan ve insan sağlığı açısından mikotoksin üreten en önemli mantar türleri arasındadır. Ürünlerde toksin sentezi hasatlamadan depolama koşullarına kadar her aşamada gerçekleşebilir. Isı ve nem mantarların üreme kabiliyetlerini dolayısıyla da üretilen mikotoksinlerin miktar ve tipini etkiler (3).

Mikotoksinlerin akut, kronik, mutajenik ve teratojenik etkileri vardır. Akut olgularda genellikle karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında bozulma ilerleyen dönemlerde de ölüm gözlenir. Bazı mikotoksinler ise protein sentezini engeller ve bağışıklık sistemini büyük ölçüde baskılar. Düşük dozda uzun süre alım durumunda kanser oluşumuna özellikle karaciğer kanserine eğilimi artırır. Bazı mikotoksinler DNA replikasyonunu değiştirir böylece mutajenik ve teratojenik etkiler sergiler. Mikotoksinlerin oluşturabileceği muhtemel belirtiler kimyasal yapıları ile yakından ilişkilidir; bazı toksinlerle zehirlenme belirtileri ölüme kadar çok belirgin olmamakla birlikte, bazıları ise deri nekrozu, lökopeni ve bağışıklık sisteminin şiddetle baskılanması gibi fark edilebilir belirtiler ortaya çıkarabilir (4). Mikotoksinin oluşturacağı zehirli etkinin boyutu aynı zamanda maruziyet süresi, dozu, yaş, cinsiyet ve genetik faktörlerle de yakından ilişkilidir (5).

Okratoksinler tahıllar ile çay ve kahve gibi ürünlerin doğal kirleticileri arasındadır. Mide-bağırsak sisteminde özellikle on iki parmak bağırsağından ve jejunumdan kolayca emilir. Bu toksinler, *Aspergillus* ve *Penicillium* türü mantarlar tarafından sentezlenir. Dört okratoksin bileşeni vardır ve bunlar okratoksin A, B, C ve D'dir. En uygun üreme koşulları % 15-19 rutubet ile 15 °C ve üzeri ısılardır. Demir, bakır ve çinko iyonları varlığında, maksimum pH 5,5'de mantarlar toksin üretebilirler. Okratoksin A, en yaygın; okratoksin A ve C ise en zehirli olanıdır. Proteinlere bağlanma duyarlılığı oldukça yüksektir ve böbrek, karaciğer ve dalakta önemli bozukluklara sebep olur. Kahvelerde okratoksin A oluşumuna sebep olan mantarlar genelde *A. carbonarius* ve *A. niger*'dir (3, 6-8).

Son yıllarda ülkemizde gıda sektörü ile ilişkili olarak çeşitli bulaşanların tespiti, denetimi ve önlenmesine yönelik yasal uygulamalar hız kazanmıştır. Bu bağlamda muhtemel gıda kirleticilerinin gıdalardaki mevcudiyeti, öncelikle sağlık açısından olmak üzere ekonomik anlamda da önemli olumsuzlukları beraberinde getirmesi muhtemeldir. Mikotoksinler ürünlerde rastlanan olumsuzluk faktörlerinin başında gelmektedir. Bu bileşenlerin geniş bir yelpazeyi içine alan zehirli etkileri (karsinojenik,

mutajenik, teratojenik ve organlarda bazı görevsel bozukluklar) önemlerini her geçen gün daha da artırmaktadır. Okratoksinlerin muhtemel sentez koşullarının diğer mikotoksinler göre farklılık gösterebilmesi, bazı olumsuz koşullarda dahi sentezlenebilmesi ve farklı fiziksel-kimyasal ortamlara dayanıklı olması sebebiyle riskli toksinler arasında tanımlanır. Kahvelerde okratoksin varlığı Dünya genelinde bilinen bir olgudur. İnsanların yaygın olarak tükettiği bu ürün hasatlamadan tüketime sunulana kadar geçen süreçte uygun metotlar uygulanmadığı takdirde okratoksinle kirlenme riskiyle karşı karşıya kalır. Yukarıda özetle değinilen hususlardan yola çıkarak bu çalışmanın yapılması planlanmış ve Türkiye'nin farklı illerinden toplanan kahve numunelerinde hem EIA hem de HPLC analiz yöntemleri ile örneklerin okratoksin A kalıntısı yönünden incelenmesi amaçlanmıştır. Mevcut çalışma ve bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar, Türkiye'de tüketime sunulan kahvelerin bahse konu mikotoksin yönünden bir risk taşıyıp taşımadığının ortaya konulmasına ışık tutması açısından önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Okratoksin A 1960'lı yıllarda mikotoksikoloji araştırmalarına yoğunluk verilmesiyle birlikte, hayvanlarda zehirli etki göstermelerinden yola çıkılarak aflatoksinlerle birlikte ilk keşfi gerçekleştirilen mantar metabolitlerinden biridir. Normal koşullar altında ürünlerde ppb düzeyinde bulunabilmesine rağmen istisnai durumlarda bu düzey ppm'e kadar da çıkabilmektedir. Bu durum ürünlerde tespiti için oldukça ileri analiz yöntemlerini zorunlu kılmaktadır (9). Okratoksin A tahıl, üzüm, kahve, baharat ve kakao'da ısıya dayanıklı olmaları sebebiyle yaygın olarak bulunabilen mikotoksinlerdendir. Bu zehirli metabolit, tahıllarda genelde *P. verrucosum*; üzüm, kahve ve kakao'da *A. carbonarius*, *A. niger* tarafından sentezlenir. Ürünlerin yetiştirilmesi, harmanlanması ve depolanması sırasında mantar üremesi için en önemli faktör ısı, rutubet ve bu koşulların devamlılık süresidir. Mantar sporlarının yoğunluğu, haşere, hava koşulları (rüzgar, yağmur gibi), yem bileşeni, pH, oksijen veya karbondioksit düzeyi etkili diğer faktörlerdendir. Eğer uygun koşullar sağlanmazsa sadece ürünlerde okratoksin üreten mantarın varlığı okratoksin sentezi için yeterli değildir (10).

Mikotoksinler içinde en fazla değerlendirilen ve öncelikli olarak düzenlemeler yapılan aflatoksinler olmasına karşın diğer toksinlerden farklı olarak düşük sıcaklıklarda da

sentezlenebilmesi sebebiyle okratoksinler üzerinde durulması gereken toksinler arasında yer almaktadır. Maruziyet sonucu vücutta kalış süresinin uzun olması da ürünlerinden faydalandığımız hayvanlar ve bunu tüketen insanlar için önemli bir etmen olarak görülmektedir. Ayrıca insanların doğrudan tükettiği ürünlerden özellikle kahve, şarap ve birada varlığı açısından önemli bir risk taşımaktadır (11).

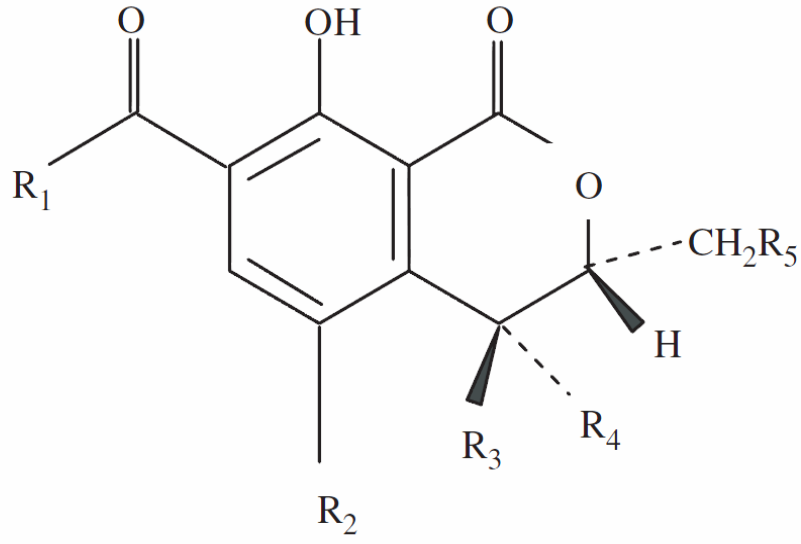
2. 1. OKRATOKSİN A

2.1.1. Özellikleri ve Kaynakları

Okratoksin A amid bağıyla L-β-fenilalanin grubuna, 7-karboksi grubu aracılığı ile bağlı 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi-3,4 dihidro-3R-metilsiklokumarin grubu içeren bir bileşiktir. Okratoksin A'nın çeşitli formları fenil alaninin diğer aminoasitler ile yer değiştirilmesi ile hazırlanır. Tirozin, valin, serin ve alanin formları en zehirli; metiyonin, triptofan ve glutamik asit analogları orta derece zehirli; glutamat ve prolin analogları ise düşük oranda zehirliliğe sahiptir. Okratoksin A'nın fenilalanindeki karboksil grubu ile 8-hidroksil grubu iki iyonize gruba sahiptir. Fizyolojik koşullar altında ise iyonize ve iyonize olmayan durumda bulunabilir; pKa değeri 7,05-7,10'dur ve zehirliliğinde karboksil grubunun rolü bilinmemektedir (12).

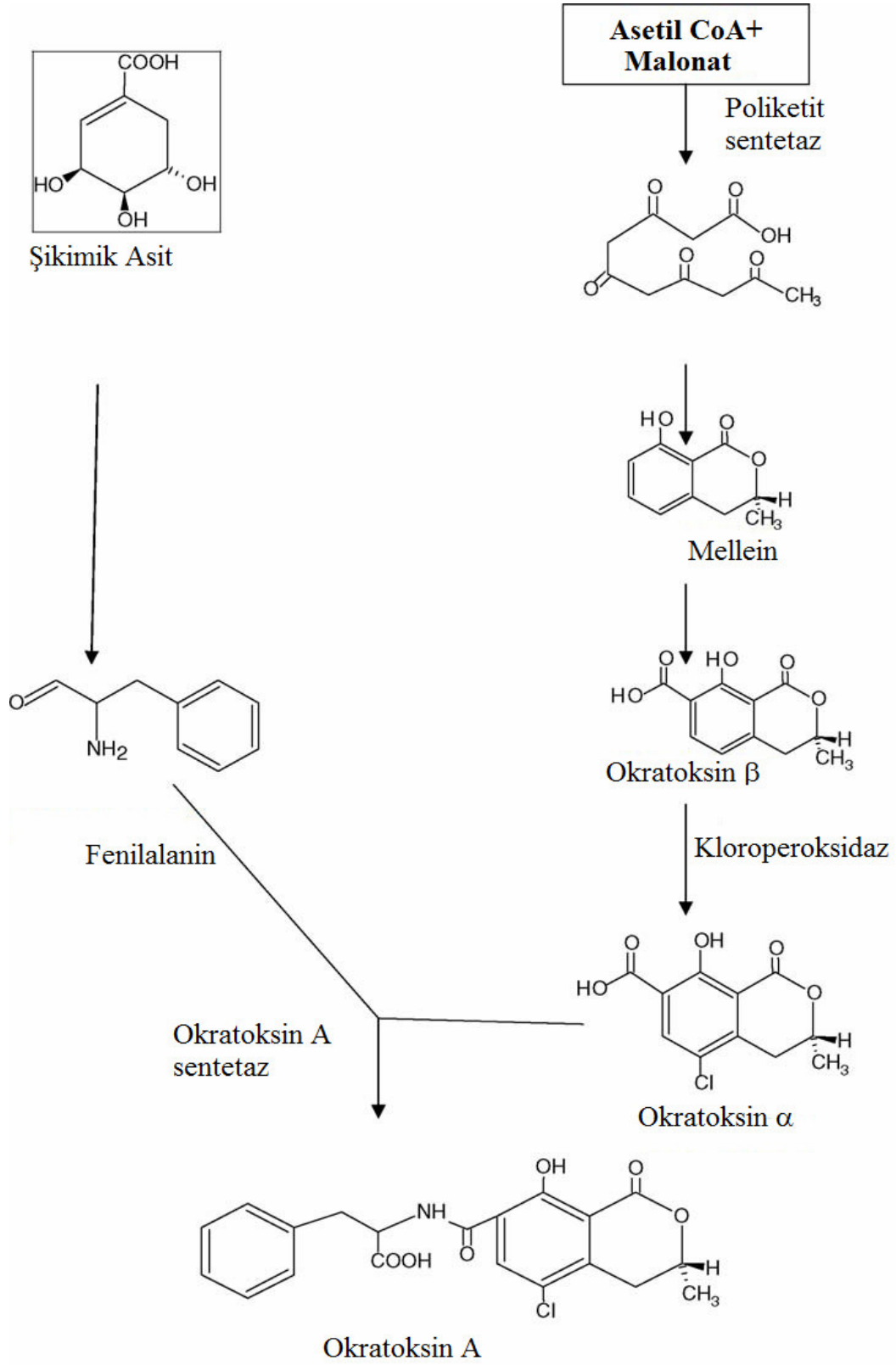
Okratoksin A okratoksin ailesinin en önemli ve en çok rastlanan üyesidir. Başta *Aspergillus ochraceus* ve birkaç ilişkili *Aspergillus* türleri (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, *A. sulphurous*, *A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. melleus*) ile tek *Penicillium* türü olan (*P. verrucosum*) tarafından sentezlenmektedir (Şekil 2.2) (6, 11).

Kapalı kimyasal formülü $C_{20}H_{18}O_6NCl$ ve molekül ağırlığı 403,82'dir. Açık formülü L-fenilalanin -N- [(5-kloro-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-methyl-1-oxo-1H-2 benzopiran7) - karbonil] -8r)-izokumarin'dir (Şekil 2.1). Beyaz, kristalize, organik çözücülerde yüksek oranda çözünen; suda çözünürlüğü zayıf fakat sulu hidrojen karbonatta çözünebilen bir bileşiktir. Kaynama noktası benzen ve ksilende sırasıyla 70 °C ve 171 °C'dır. UV absorpsiyonu 333 nm, floresans maksimum emisyonu % 96 etanolde 467 nm, absole etanolde ise 428 nm'dir ve zayıf asidik özelliktedir (13, 14).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
OTA	Fenilalanin	Cl	H	H	H
4R-OH-OTA	Fenilalanin	Cl	H	OH	H
4S-OH-OTA	Fenilalanin	Cl	OH	H	H
OT α	OH	Cl	H	H	H
1O-OH-OTA	Fenilalanin	Cl	H	H	OH

Şekil 2.1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı ve bazı metabolitleri (15).



Şekil 2.2. Okratoksin A'nın biyolojik olarak sentez aşamaları (13)

2.1.2 Toksikokinetik

Toksikokinetik, okratoksin A'nın zehirliliğini etkileyen faktörlerdendir. Sindirim kanalından emildikten sonra serum proteinlerine bağlanır. Türlerle ilişkili olarak serumdaki yarı ömürlerindeki önemli farklılık, proteinlere bağlanma oranları ve bağlanma duyarlılığı ile yakından ilişkilidir. İnce bağırsağın ilerleyen kısımlarından safra aracılığı ile geri emilim okratoksin A'nın farklı dokulara yeniden dağılımını beraberinde getirir. Ayrıca, okratoksin A'nın geri emilimi böbreğin proksimal ve distal tübüllerinde de söz konusu olmaktadır. Birikim büyük oranda kan, karaciğer ve böbrekte şekillenir. Okratoksin A'nın metabolizması günümüzde çok detaylı olarak izah edilememiştir. Bütün türler için hem karaciğer hem de böbrek aracılı atılım zehirin plazma klirensinde önemli rol oynar (Tablo 1, 2) (13).

2.1.2.1. Emilme

Okratoksin A'nın fenilalanin kalıntısı ile fenolik grup için pKa değerleri sırasıyla 4,2-4,4 ve 7,0-7,3 arasındadır. Bu asidik kalıntıların okratoksin A'nın emiliminde önemli rolleri bulunmaktadır. Çoğu hayvan türlerinde iyonize olmamış ve tekli anyon şeklinde mideden ve on iki parmak bağırsağının üst kısmından pasif olarak emilir. Pasif emilimin plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanmasında katkısı bulunmaktadır. Biyoyararlanım hayvan türlerine göre değişkenlik gösterir (domuzlarda % 66, ratlarda % 56, tavşanlarda % 40). Besin bileşeni de biyoyararlanımı önemli oranda değiştirmektedir (16).

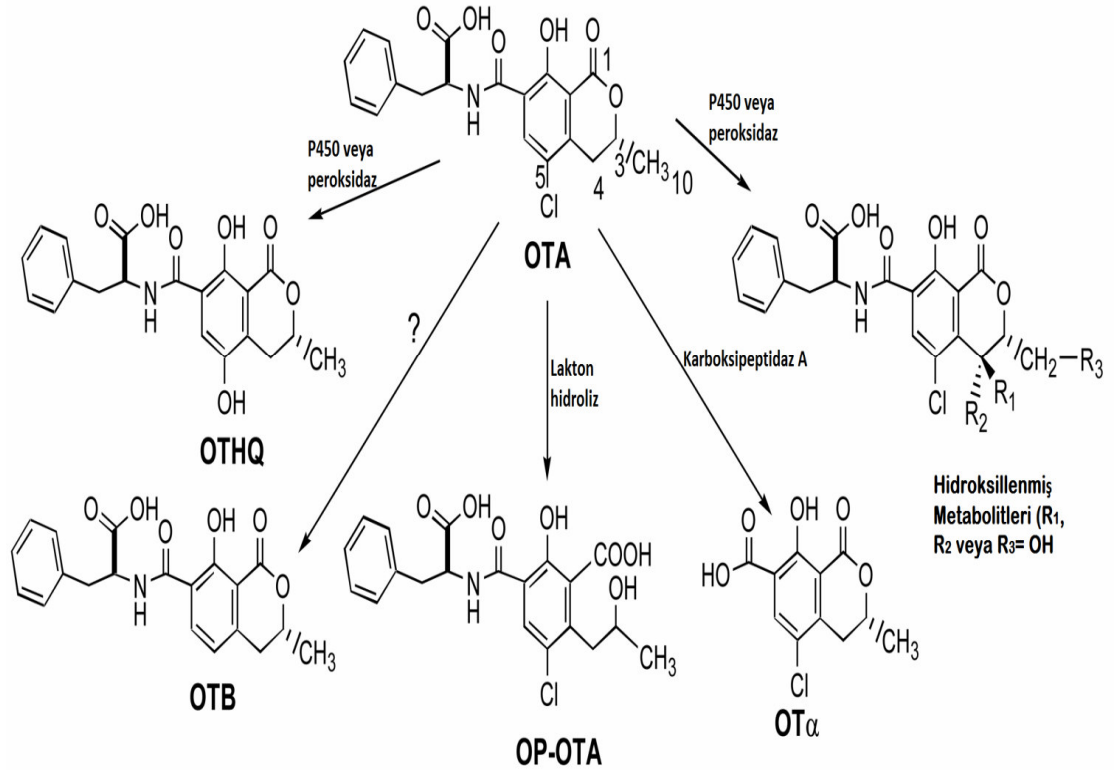
2.1.2.2. Dağılım

Kan dolaşımına ulaşır ulaşmaz okratoksin A plazma proteinlerine özellikle de albümine % 99 oranında bağlanır. Eritrosit ise çok düşük düzeyde toksin içerir. Albümin düzeyindeki düşüşler atılımını 20-70 kat artırmaktadır. Sığır serum albümine toksin 2:1 molar oranda izokumarin ve fenolat iyonu olmak üzere iki farklı bölgeden bağlanır. Bağırsak-karaciğer dolanımı oldukça yüksek olan bu bileşik, safrayla atıldıktan sonra yüksek oranda tekrar emilir. Bağırsağa salınan toksinin tekrar emilimi bağırsak mikroflorasında konjugatın hidrolizi ile gerçekleşir. Doku ve plazmadaki zehir yoğunluğu hayvanın türü, alınan doz, alınan şekli (kristal ya da doğal olarak besin içinde), diyet bileşeni ve sağlık durumu ile yakından ilişkilidir. Kandan atılım yarı ömrü, kan proteinlerine bağlanma duyarlılığının daha yüksek olması sebebiyle dokudan daha uzundur. Dokulardaki dağılımı domuz, rat, tavuk ve keçi için büyükten küçüğe

doğru böbrek, karaciğer, kas ve yağ dokusu ya da böbrek, kas, karaciğer ve yağ dokusu izler. Böbreklerde proksimal tubüllere yerleşmiş olan 62 kDa ağırlığındaki proteine karşı duyarlılığının yüksek olması öncelikle böbreklerde birikmesine yol açar. Fötal serumda anne serumundan iki kat fazla toksine rastlanması plasenta aracılığı ile geçtiğini göstermektedir. Bu geçişte çevresel, genetik ve patolojik faktörlerin önemi büyüktür. Kanatlı türlerinde yüksek dozda alınan okratoksin A yumurtaya da geçebilmektedir (13).

2.1.2.3. Metabolizma

Okratoksinin metabolitleri olan 4(R)-, 4(S)- ve 10-hidroksiokratoksin A, sitokrom P450 yada böbrekteki peroksidazlar (prostoglandin-H-sentaz) ve lipooksijenazlarca şekillenir. Okratoksin α karbosi-peptidaz A tarafından okratoksin A'daki peptid bağlarının ayrılması ile oluşur. Okratoksin B, okratoksin A'dan sitokrom P450 aracılığı ile şekillenir. Bu metabolitler okratoksin A'dan daha hızlı atılır ve zehirlilikleri daha düşüktür (17). Okratoksin A'nın metabolizmasında özellikle ruminantlarda rumende, ruminantlar dışında da bağırsaklarda yer alan (sekum ve kalın bağırsak) bakterilerin etkinliği önemlidir. Bu bölgelerde enzimatik hidroliz şekillenmektedir. Asit hidroliz ise midede olmaktadır. Hidrolizde mikrobiyal flora önemli rol oynarken pankreatik enzimlerin etkinliği ise son derece zayıftır. Mikrobiyal florayı inhibe eden antibiyotikler (neomisin gibi) metabolizma hızını yavaşlatmaktadır. Mide bağırsak sisteminde belli bir oranda (% 1-4) hidrolize olur ve daha az zehirli olan okratoksin α 'ya dönüşür. Karaciğerdeki mikrozomal enzimlerin (sitokrom P450) de metabolizmada rolü büyüktür. Şekillenen okratoksin A, NADPH mevcutiyyetinde (4R) ve (4S)-hidroksiokratoksin A'ya çevrilir. Alınan okratoksinin A'nın % 1-1,5'u (4R)-hidroksiokratoksin A ve % 25-27'si okratoksin α 'ya dönüşerek atılır. Okratoksinin 4R ve 4S izomerlerinden 10-10-hidroksiokratoksin A şekillenir. Pentobarbital kullanımı okratoksin metabolizmasını hızlandırır dolayısıyla zehirlilik düşer. Okratoksinin 4-hidroksi formu türe göre zehirsizdir veya daha az zehirlidir. Okratoksin A'nın tirozin-OA metaboliti zehirlenen hayvanların karaciğerinde yüksek oranda bulunur ve okratoksin A kadar zehirlidir (Şekil 2.3) (12, 18).



Şekil 2.3. Ochratoxin A'nın metabolizması (16).

2.1.2.4. Eliminasyon

Ochratoxin A hızla emilen fakat yavaş atılan birikici karakterde bir toksindir. Bütün türlerde hem dışkı hem de idrarla atılım zehirin plazma klirensi için önemlidir. Memelilerde sütle atılım da söz konusudur. Zehirin plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanması glomerüler filtrasyonu sınırlandırmaktadır. Tubuler atılıma maruz kalır fakat bütün nefron bölgelerinden tekrar emilir. Bu atılımlar ve geri emilimler taşıyıcı proteinler (özellikle anyonik olanlar) aracılığı ile olur. Bu taşınmanın karakteristiği para-aminohippurik-asit taşıma sistemi olarak bilinir ve inhibitörü probenesittir. Aynı zamanda zehir ve metaboliti olan okratoksin α dışkıyla da uzaklaştırılır. Bu atılımda safra önemli rol oynar ve yine anyonik proteinler aracılığı ile gerçekleşir. Sütle atılım, doğal bulaşık gıdaların yenilmesi sonucunda gözlenen atılım şekillerinden birisidir. Mikotoksinin meme bezine geçişi pasif difüzyon ile olmaktadır ve süt/plazma oranı 0,1-0,2 arasındadır (7, 13).

Tablo 2.1. İnsan ve hayvanlarda okratoksin A'nın tek doz ağızdan verilmesi sonucunda kinetik parametreler (15).

Tür	Cinsiyet	Uygulama Şekli	F (%)	$t_{1/2\alpha}$ (saat)	$t_{1/2\beta}$ (saat)	Cl (ml saat ⁻¹ kg ⁻¹)	Dağılım Modeli (Bölme)
İnsan	Erkek	Etanol/tuz	>85,5	20,13	853,2	0,09	2
Maymun (M. mulata)	Erkek	NaHCO ₃	57	TED	510	0,18	1
Maymun (M. mulata)	Dişi	NaHCO ₃	57	TED	510	0,18	1
Rat (F344)	Erkek	Mısır yağı	TED	TED	224	TED	1
Rat (F344)	Dişi	Mısır yağı	TED	TED	231	TED	1
Rat (Wistar)	Erkek	NaHCO ₃	44	TED	120	0,91	2
Rat (Sprague – Dawley)	Erkek	NaHCO ₃	TED	2,1	57,8	TED	2
Fare (NIH-Bethesda)	Erkek	NaHCO ₃	97	TED	39	6,1	2
Balık (C. caprio)	Bildirilmemiş	NaHCO ₃	1,6	TED	0,68	58	2
Bıldırcın (C. coturnix)	Erkek	NaHCO ₃	62	TED	6,7	57	2
Bıldırcın (C. coturnix)	Dişi	NaHCO ₃	62	TED	6,7	57	2

Tablo 2.2. İnsan ve hayvanlarda okratoksin A'nın tek doz damar içi verilmesi sonucunda kinetik parametreler (15).

Tür	Cinsiyet	Uygulama Şekli	$t_{1/2\alpha}$ (saat)	$t_{1/2\beta}$ (saat)	Cl (ml saat ⁻¹ kg ⁻¹)	Dağılım Modeli (Bölme)
Maymun (<i>M. mulata</i>)	Erkek	NaHCO ₃	-	840	0,17	2
Maymun (<i>M. mulata</i>)	Dişi	NaHCO ₃	-	840	0,17	2
Maymun (<i>C. aethiops</i>)	Dişi	NaHCO ₃	58-72	462-495	0,22	2
Domuz	Bildirilmemiş	Corn oil	-	150	1,5	2
İnek	Bildirilmemiş	Corn oil	1,8	77	-	2
Rat (Sprague – Davley)	Dişi	Etanol/Tuz	2,7	103	3,11	2
Rat (Sprague –Davley)	Erkek	NaHCO ₃	1,5	53,3	-	2
Rat (Wistar)	Erkek	NaHCO ₃	-	120	0,92	2
Fare (NIH-Bethesda)	Erkek	NaHCO ₃	-	48	6,1	2
Tavşan	Bildirilmemiş	NaHCO ₃	1,9	8,2	-	2
Balık (<i>C. caprio</i>)	Bildirilmemiş	NaHCO ₃	-	8,3	57	2
Bıldırcın (<i>C. coturnix</i>)	Erkek	NaHCO ₃	-	12	86	2
Bıldırcın (<i>C. coturnix</i>)	Dişi	NaHCO ₃	-	12	86	2
Tavuk	Bildirilmemiş	NaHCO ₃	0,5	4,1	-	2

2.1.3. Etki Şekli

Okratoksin A protein sentezini önemli oranda inhibe eder. Protein sentezi inhibisyon mekanizmasını fenil-alanin-tRNA sentetaz ile katalizlenen tepkimede fenilalanin ile yarışarak gösterir. Bu inhibisyon düşük dozlarda daha az belirgindir. Okratoksin A nefrotoksik etkisini mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve serbest radikal üretimine sebep olarak gösterir. Flavoprotein NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve Fe^{+3} , oksijen varlığında Fe^{+2} iyonuna indirgenmesini kolaylaştırarak lipid peroksidasyona yol açan hidroksil radikali üretimini artırır. Bu tepkimede sitokrom P450'nin rolü de bulunmaktadır. Doğrudan elektrokimyasal, fotokimyasal ve kimyasal süreçler sonunda okratoksin A fenol oksidasyonu ile hidrokuinon/kuinon çifti oluşur. Kuinon DNA'ya kovalant bağ ile bağlanır ve sonuçta semikuinon ve hidrokuinon şekillenir. Bu olaylar redoks tepkimeleri ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile sonuçlanır. Hücresel solunumu ve oksidatif fosforilasyonu etkileme mekanizması, mitokondriyal membranı bozması ve solunum zincirinde süksinat aracılı elektron transferini inhibe etmesi ile ilişkilidir. Bu etkiyi doğrudan ATPaz, süksinat dehidrojenaz ve sitokrom C oksidazı da inhibe ederek gösterir. Toksin hücre içi-dışı kalsiyum dengesini değiştirir. Kalsiyum dengesindeki bozukluk ve hücre içi kalsiyum yoğunluğundaki artış hücre tahribatını beraberinde getirir. Kalsiyum, hücre içi haberci sisteminde kalmodulin ve protein kinaz C'nin aktivasyonunda önemli rol onar. Okratoksin A epidermal üreme faktörü ve anjiyotensin II aracılığı ile kalsiyum bağımlı hücre çoğalmasını aktive eder. Ekstrasellüler protein kinaz ve kaspazı etkinleştirerek apoptozise sebep olduğu söylene de bu konuyla ilgili çalışmalar devam etmektedir (19, 20).

2.1.4. Zehirliliği ve Etkileri

Bağışıklık sistemi yabancı hücelere ve parazitik organizmalara karşı önemli savunma sistemidir. Bağışıklık sisteminin baskılanması enfeksiyöz hastalıklara karşı vücudu duyarlı kılar; konakçıda kanser hücrelerinin oluşumunu ve dönüşümünü hızlandırır. Memelilerde bağışıklık sistemi oldukça karmaşıktır. Makrofajlar ve lenfositler bağışıklık sisteminin hücresel unsurlarıdır. Lenfositlerin iki önemli formu T ve B hücreleri sırasıyla timüs ve karaciğerde farklılaşır. T lenfositleri hücresel aracılı bağışıklıktan sorumludur ve sitotoksik, yardımcı ve baskıcı T hücreleri olarak bilinir. B hücreleri antikör üretiminden sorumludur. Bu hücreler ile T hücreleri arasında etkileşim

vardır. Diğer hücre tipleri makrofajlardır. Mikotoksinlerin bağışıklık sistemi üzerine etkileri farklılık gösterir (21).

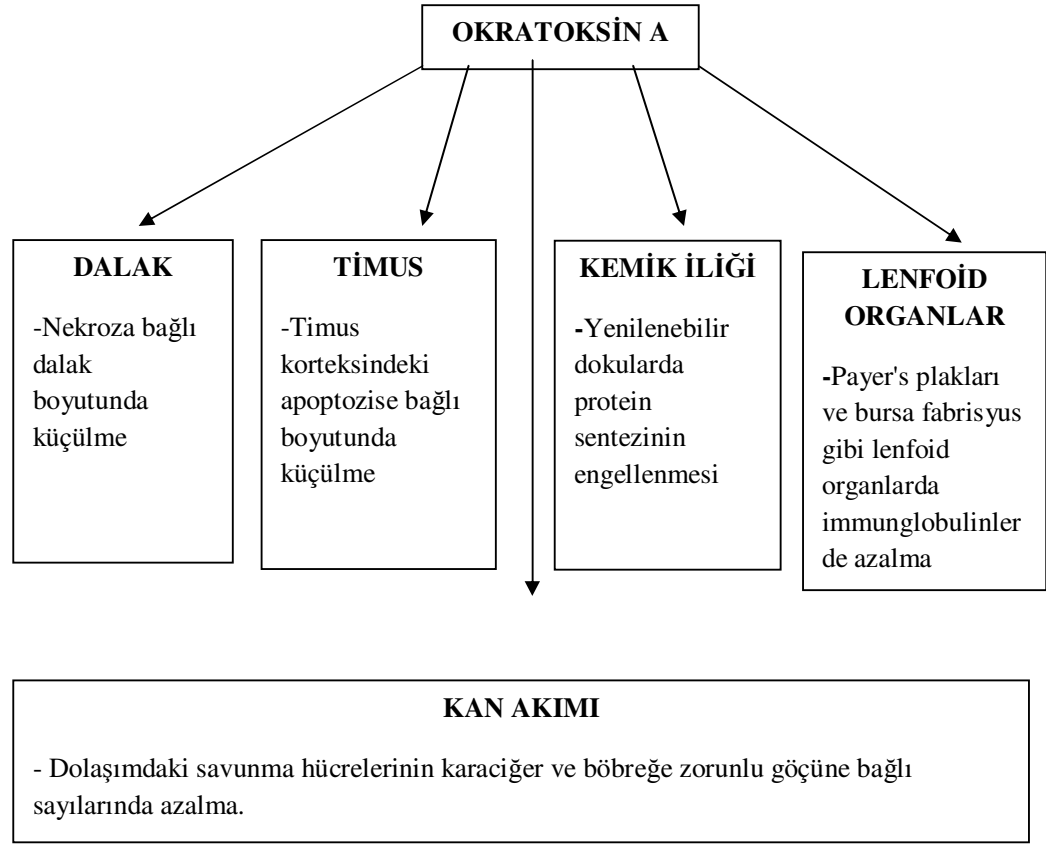
Okratoksin A'nın sitotoksik etkisi substrat olarak fenilalaninin kullanıldığı tepkimedeki enzimlerin aktivasyonu veya inhibisyonu temeline dayanır. Okratoksin A'nın hedefi ökaryot, prokaryot, memeli hücreleri ile deneysel hayvanlarda fenilalanin-tRNA sentetazın inhibisyonudur. Bu inhibisyon, akut ve subakut okratoksin A zehirliliğinden sorumlu protein sentezinde azalmaya sebep olur. Protein sentezindeki inhibisyona ek olarak DNA ve RNA sentezi de okratoksin A zehirlenmesinin hedefleri arasındadır. Fosfoenolpürivat karboksilaz, glukoneogenetik yolda temel enzimdir ve okratoksin A tarafından etkilenir. Etkisi muhtemelen enzim sentez aşamasında mRNA kodlanması ile ortaya çıkar. Ayrıca glikolitik enzimler, süksinat sitokrom C redüktaz ve süksinat dehidrojenaz da bu zehir tarafından inhibe edilir. Okratoksin A'nın çeşitli doku ve organlarda (üriner sistem, karaciğer, dalak, lenflerde) apoptozisi hızlandırdığı gözlenmiştir. Bu etkisini sitokinler (özellikle tümör nekrozan faktör), mitokondriyal solunum zincirinin etkilemesi ve serbest radikal oluşumunu hızlandırması aracılığı ile gösterir. Bağışıklık sistemini baskılaması çeşitli türlerde önemli bağışıklık organlarının ağırlığında azalma ile karakterizedir. Timüs, dalak, bursa fabrisius ve lenf yumruları okratoksin A için hedef dokulardır. Lenfoid hücrelerindeki azalma antikör üreten hücreleri de içine alır. Alfa-1, alfa 2, beta ve gamma globulin düzeyini düşürür. Ayrıca Ig G, M, A seviyesi ile beyaz kan hücrelerinde azalmaya neden olur. Kemik iliğinde baskılanmaya yol açar. Dolaylı olarak beyaz kan hücreleri ile bağışıklık sisteminde görevli diğer hücrelerin hedef doku ve organlara göçünü engeller. Sitokin salınım ve sentezinde özellikle tümör nekrozan faktör alfa, interlökinlerde önemli değişimlere sebep olur (Tablo 2.3). Oktatoksin A çeşitli hayvan türlerinde mide barsak lenf yumruları ile timusda nekroz yapar (Tablo 2.4; Şekil 2.4) (22).

Doku ve organ düzeyinde etkileri özellikle böbrek üzerinedir. Okratoksin maruziyetinde insanlarda böbrek korteksinde tubullerde yıkımlama, intertisiyel fibrosis ve glomerüllerde hyalinleşme ile karakterize bozukluk Balkan Endemik Nefropatisi olarak tanımlanmıştır. Genellikle prognozu kötü ve ölümcül olabilecek bir zehirlenme olgusudur. Zehir ayrıca üriner sistem tümörlerine (özellikle pelvis ve üriner sistem tümörleri) de eğilimi artırır (23).

Okratoksin A'nın karsinojenik etkisi özellikle karaciğer ve böbrek DNA'sına bağlanması ile yakından ilişkilidir. Metabolitlerinin ise benzer etkileri yoktur (24). Okratoksin A ruminantlarda rumen mikroorganizmaları tarafından yıkımlanması sebebiyle zararlı olmaz fakat domuzlar ve kanatlılar için riskli bulunmaktadır (9, 25). Tek başına olduğu gibi diğer toksinler ve mikroorganizmalarla da etkileşim haline girebilir. Bu etkileşim çoğu zaman sinerjistiktir. Özellikle nefrotoksik etki yönünden Balkanlarda rastlanan Hantan virusu ile etkileşimi kronik böbrek hasarını beraberinde getirir. Yine farklı bir mikotoksin olan deoksinivalenol ile olan etkileşimi ise böbrek hastalıklarına sebep olur (Tablo 2.3) (26).

Tablo 2.3. Farklı bitkisel ürünlerde karşılaşılan okratoksin ile diğer mikotoksin kombinasyonları (26).

Mikotoksin	Kombinasyon
Okratoksin	Sitrinin
Okratoksin	Zearalenon
Okratoksin	Penisilik asit
Okratoksin	Aflatoksin B ₁



Şekil 2.4. Okratoksin A'nın bağışıklık sistemi üzerine etkileri (22).

Tablo 2.4. Okratoksin A'nın sitokinler üzerine etkileri (22).

Sitokin	Hücre Tipi/Modeli	OTA Dozu	Etkisi
TNF- α	Makrofaj hücreleri, monosit, karaciğer hücreleri	400 ng/ml, 0,8-1 μ g/ml, toplam 100 ng	Makrofajlarda uyarılma, diğerlerinde baskılanma
IL-6	Makrofaj hücreleri, karaciğer hücreleri	0,8-1 μ g/ml	Makrofaj hücrelerinde etkisiz, karaciğer hücrelerinde uyarılma
IL-5	Makrofaj hücreleri	-	Baskılanma
IL-1	Timüs hücreleri	5-10 μ g/ml	Uyarılma
IL-2	T-lenfosit, lenfosit hücreleri, timüs hücreleri	5-10 μ g/ml	T-lenfositlerde baskılanma, timüs hücrelerinde uyarılma, lenfositlerde etkisiz/baskılanma

2.1.5. Tanı

Genelde laboratuvar analizleri ile gerçekleştirilir. Günümüze kadar mikotoksinlerin analizine yönelik kırkı aşkın resmi metot yayınlanmıştır. Okratoksin A insanlarda ve diğer hayvan türlerinde serum albüminine bağlanır. Plazmada düşük molekül ağırlıklı moleküllere bağlanma duyarlılığı oldukça yüksektir. Bu sebeple de kloroform ve diklormetan gibi organik çözücülerle; magnezyum klorit, fosforik asit ve hidroklorik asit gibi bileşikler aracılığıyla (pH'ı değiştirmek suretiyle) biyolojik ortamdan kolayca uzaklaştırılır. Plazmanın fosforik asitle asitleştirilmesi ve ardından kloroformla ekstraksiyonu en etkili analiz yöntemi olarak görülmüştür. Plazma veya serumdan aseton-fosfat tampon veya sodyum bikarbonat tampon kullanarak yapılan ekstraksiyon işlemleri ise nadiren tercih edilir. Temizleme aşamasında genellikle katı faz ekstraksiyon ve immunoaffinite kolon kromatografisine başvurulur (27, 28).

Geleneksel anlamda mikotoksin analizleri için en yaygın metot ince tabaka kromatografisidir. Kalitatif ve yarı-kantitatif amaçlı UV-spektral analizle birleştirilerek kullanımı günümüzde de devam etmektedir. Ayrıca daha modern ve duyarlı cihazlardan ELISA, yüksek performanslı sıvı kromatografi, yüksek performanslı sıvı

kromatografi/kütle spektrofotometri, gaz kromatografi ve gaz kromatografi/kütle spektrofotometri miktar tayinlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (29, 30). Analizlerde ayrıca okratoksin A ile eş zamanlı olarak aflatoksinlerin tespit edilebildiği yüksek performanslı likit kromatografi esaslı yöntemler de vardır (Tablo 2.5) (31).

Tablo 2.5. Okratoksin A analizlerinin temizleme ve ekstraksiyon aşamasında kullanılan katı faz ekstraksiyon, ayırma ve tespit metotları (30, 32).

Bileşik	Metot
Ekstraksiyon	
Katı Faz Ekstraksiyon	C-18 Katı Faz Ekstraksiyon Kolonu
	İmmunoaffinite Katı Faz Ekstraksiyon Kolonu
	İmmunoaffinite C18-RP Kolonu
	Katı Faz Mikroekstraksiyon Sistemi
Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon	
Ayırma ve Tespit	
	İnce Tabaka Kromatografi
	Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (Floresans Dedektör, Tandem MS, Likid Kromatografi Elektrosprey)
	Gaz Kromatografi/Kütle Spektrofotometri
	Likit Kromatografi/ Kütle Spektrofotometri/ Kütle Spektrofotometri
	ELISA

2.1.6. Korunma ve Sağaltım

Okratoksin A'ya gıdalarla maruziyet, gıda işleme metotlarındaki farklılıklarla ilişkili olarak değişkenlik gösterir. Mikotoksinler genelde dayanıklı bileşikler olmakla birlikte özellikle de okratoksinlere orta derecedeki ısıya dayanıklı olması sebebiyle işlenmiş ürünlerin son aşamasında dahi rastlanabilmektedir (33).

Okratoksin A'yı etkisiz kılma metotları fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik olmak üzere üç farklı aşamada değerlendirilebilir. Bu tekniklerdeki amaç mikotoksinlerin yıkımlanması, daha zararsız bileşiklere dönüştürülmesi ve emiliminin engellenmesidir. İdeal bir zehirsizleştirme metodu kolay uygulanmalı ve ekonomik olmalıdır. Besinlerde zehirli bileşikler şekillendirmemeli ve besin kalitesini değiştirmemelidir. Avrupa Birliği ülkeleri bulaşmamış besinlerle seyreltmeye ve gıda maddelerinin zehirsizleştirilmesine izin vermemektedir. Öncelikle okratoksin A kirliliğinden kaçınmak için bu mantar metabolitlerini sentezleyen mantarları etkisiz kılınmak gerekir. Isı uygulamaları okratoksin A'yı tamamıyla yıkımlamaz. Hızla soğutma (-20 °C) ve ardından ısıtma (26 °C), UV ve gama ışın uygulaması mantar kolonilerinin oluşumunu sınırlayabilir. Ayrıca yalnızca gama radyasyon uygulaması mikotoksinleri yıkımlayabilir. Kimyasal bileşikler ile okratoksin A'nın etkilerinin önlenmesinde aktif kömür, kolestiramin, sodyum kalsiyum aluminasilikat, bentonit ve zeolit sıklıkla kullanılmaktadır. Alkali hidrojen peroksit, sodyum hidroksit ve kalsiyum hidroksit uygulamaları da etkili metotlar arasındadır. Diğer bir metod da ozonizasyondur. Mikrobiyolojik olarak *Acinetobacter calcoaceticus*'un okratoksin A'yı yıkımlama özelliği bulunmaktadır ve toksini daha az zehirli olan α -okratoksine çevirir. Elektrokimyasal tekniklerin gelişimi ile ozon kullanımı gıdalarda okratoksin A düzeyini tespit edilemeyecek düzeylere indirir. Karboksipeptidaz A, okratoksin A'yı yıkımlayan enzimlerdendir. Bu mikotoksinin serbest radikal oluşturma potansiyelinin yüksek olması sebebiyle antioksidan özellikleri bulunan melatonin, rosmarinik asit, α - tokoferol, retinol, siyanidin-3-o-b-glukopiranozin, askorbik asit, L-metionin, aspartam, polifenol, antioksidan kombinasyonu ve farklı alkaloidler muhtemel zehirli etkilere karşı kullanılabilir (34, 35).

Ayrıca ürünlerin hasatlanması, işlenmesi ve depolama koşullarına da dikkat edilerek mantarların okratoksin üretimi için uygun koşulları oluşturmalarının önüne geçilebilir (8). Donmuş gıdalarda öncelikli olarak şekillenen *A. ochraceus*'un üremesini engellemek için kuru gıdalarda kullanılan standart uygulamalar yapılır. En etkili yöntem gıdalardaki rutubet oranının 0,8'in altına indirilmesidir. Ortamın havalandırılması, haşerelerle mücadele ve gıdaların kapalı olarak muhafazası dikkat edilmesi gereken diğer hususlar arasındadır (36).

Tahıllardan hazırlanan ürünlerde, özellikle ekmeklerde pişirme sırasında okratoksin A kaybı söz konusu olmaz. Fakat bisküvilerin pişirilmesi sırasında 2/3 oranında bir kayıp

vardır. Suda basınç altında pişirilen ürünlerde ise % 84 oranında kayıp gözlenir. Otoklavlamak suretiyle yapılan uygulamalarda ise yıkımlanma yaklaşık % 50-88 arasında değişir. Kahvelere uygulanan ısı işlemlerde yıkımlanma % 13-93 arasındadır. Yüksek ısıyla birlikte nem, okratoksin A yıkımlanmasını hızlandırır. Rutubetin % 30 olduğu ortamlarda 116-120 °C'da kayıp % 12 iken 133-136 °C'da % 23,5'dir. Rutubetin % 13,4 olduğu koşullarda 191-196 °C'da ortalama kayıp % 31; % 17,5 olduğunda ise 157-164 °C'dır. Bu yıkımlanma oranları gıdaların kalış süreleri ile artış gösterir. Fakat hiçbir zaman başlangıç miktarına göre % 40'ın üzerine çıkamaz (37).

2.1.7. Ülkemizde ve Diğer Ülkelerdeki Yasal Düzenlemeler

Okratoksin toksikokinetik özelliği gereği kanda rastlanma oranı yüksek olan bir mikotoksindir. Zehirlenmenin tanısında da kandaki düzeyinin ölçümü bu yüzden en çok tercih yöntemlerdendir. Yapılan araştırmalarda insanlarda kan okratoksin düzeyleri değerlendirilmiştir (Tablo 2.6) (16, 23).

Mantarlarca okratoksin A'nın sentez koşulları veya okratoksin A üreten mantarlar için üreme şartları ile ilgili bilgiler bulunmakla birlikte konuya yönelik çalışmalar devam etmektedir. Tarımsal ürünlerde tolare edilebilecek okratoksin A düzeyi değişkenlik göstermektedir. Bu değer, ürünler ve ülkeler için 0-birkaç µg/kg arasında değişmektedir. Avrupa birliği ülkelerinde tolare edilebilir günlük doz 5 ng/kg canlı ağırlık (2100 ng/hafta/60 kg canlı ağırlık) olarak belirlenmişken; Kanada'da 1,5-5,7 ng/kg canlı ağırlık (630-2394 ng/hafta)'dır. Gıda Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü ise bu değeri 100 ng/kg canlı ağırlık/hafta olarak vermiştir (Tablo 2.7) (1).

Tablo 2.6. Farklı yıllarda insan kan örneklerinde okratoksin A varlığı (16, 23).

Ülke	Pozitif Örnek Sıklığı (%)	Ortalama Düzey (ng/ml)	Pozitif Örneklerin Düzey Aralığı (ng/ml)
Bulgaristan	7	0,88	1,0-10,0
Kanada	100	0,88	0,29-2,37
Macaristan	77-82	-	0,2-10
Danimarka	54	1,8	0,10-13,2
Fransa	15-19	-	0,1-12
İtalya	100	0,5	0,1-2
Japonya	85	0,068	0,004-0,278
Polonya	6	0,2	1-13
İsveç	100	-	0,06-6,02
İsviçre	100	0,17	0,09-0,94
İspanya	53	0,71	0,5-4,0
İngiltere	100	1,09	0,4-3,11
Almanya	56,5-98,10	0,27-0,60	0,06-14,40

Tablo 2.7. Okratoksin A için kahvelerde farklı ülkelerin tolerans düzeyleri (ppb) (38).

Ülke	Yeşil Kahve	Kavrulmuş Kahve	Granül 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

Türk Gıda Kodeksinde göre (39), gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkındaki tebliğe göre kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahvede 5,0 ppb; kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve için 10,0 ppb olarak verilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZ, GEREÇ VE KİMYASALLAR

3.1.1. Cihaz ve Gereçler

1. EIA Spektrofotometre (BIO-TEK)
2. EIA Yıkayıcı (BIO-TEK)
3. Vortex (Heidolph Reaxtop)
4. Hassas Terazî (Sartorius TE102S)
5. Manyetik Karıştırıcı (Elektromag-M21)
6. Çalkalayıcı (Elektromag-M21)
7. Deiyonize Su Cihazı (Millipore)
8. Buzdolabı (Profilo)
9. Cam tüp
10. Otomatik pipet
11. Mutlak metanol (Merck)
12. Susuz sodyum sülfat
13. Yıkama şişesi

14. Süzgeç kağıdı
15. Emici kağıt havlular
16. Zaman ölçer
17. Cam pamuk

3. 1. 2. Kimyasallar

1. Okratoksin A EIA kiti
 - Antikor kaplı kuyucuklar (96 adet fare anti-okratoksin A antikoru ile kaplı) ve bu kuyucukların yerleştirildiği plaka.
 - Antikor kaplı olmayan kuyucuklar (96 adet kırmızı renkli).
 - Okratoksin A standartları (% 70 metanolde 0,0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 ng/ml).
 - Analiz seyreltici.
 - Okratoksin A HRP (hourse radish peroxidase)-konjugat.
 - Substrat Ayırıcı (Tetrametilbenzidin)
 - Sonlandırıcı Solüsyonu.
 - Yıkama Tamponu (% 0,05 Tween 20 ile hazırlanmış fosfat tampon).

3. 2. YÖNTEM

3. 2. 1. Analiz Materyali

Çalışmada toplam 90 adet Türkiye'nin farklı illerinden toplanan kahve örnekleri kullanıldı. Kahve örneklerinin ekstraksiyonu, analize hazır hale getirilmesi ve ölçümü için Helica Biosystems® marka kit ve analiz metodu (40) esas alındı.

3. 2. 2. Kahve Numunelerinin Analize Hazır Hale Getirilmesi

1. Kahve numunelerinin her birinden 2'şer g tartıldı. Ardından % 70'lik metanol'den 10'ar ml alınarak üzerine eklendi. Karışım 5 dk süreyle vorteks aracılığı ile karıştırıldı.

2. Vorteksten çıkan karışım süzgeç kağıdı kullanılarak huni yardımıyla önceden hazırlanmış cam deney tüplerine süzüldü. Süzgeç kağıdı içine süzme işleminden önce bir miktar cam pamuk ve onun üzerine de bir miktar susuz sodyum sülfat eklendi.
3. Deney tüpüne alınan süzüntüler daha sonra 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlemden sonra üste kalan kısımlar ayrı cam tüplere alındı.
4. Bu tüplerin her birinden 100 µl alındı ve üzerine 900 µl % 70'lik metanol ile seyreltildi. Analizde bu çözelti kullanıldı.

3. 2. 3. EIA Analiz Yöntemi

1. Analizde kullanılan bütün ayıraçlar kullanılmadan önce oda ısısına getirildi.
2. Standartlar ve analiz edilecek her bir örnek için antikor kaplı olmayan kuyucuklar (kırmızı renk) tutucuya yerleştirildi. Diğer tutucuya ise eşit sayıda antikor kaplı kuyucuklar yerleştirildi.
3. Antikor kaplı olmayan kuyucuklara (kırmızı renkli) 200 µl seyreltme çözeltisi konuldu.
4. Ardından üzerine her bir kuyucuğa standart ve örnek çözeltisinden 100'er µl pipetle ilave edildi; kuyucuk içerisinde iyice karışması sağlandı.
5. Bu kuyucuklardan 100'er µl alınarak antikor kaplı kuyucuklara aktarıldı (bu aşamada deneyin başından sonuna kadar meydana gelebilecek değişiklikleri en aza indirmek için çok kanallı pipet kullanıldı) ve oda ısısında 30 dk bekletildi.
6. Kuyucuktaki içerik atık havuzuna boşaltıldı. Bu kuyucukların her biri PBS-Tween tampon sıvısı ile doldurularak yıkandı. Bu işlem üç defa tekrarlandı.
7. Kuyucuklardaki arta kalan suyu kurutmak için kuyucuklar emici havluların üzerine ters çevrilerek konuldu.
8. Antikor kaplı kuyucuğa 100 µl konjugat eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
9. Tekrar kuyucuktaki içerik atık havuzuna boşaltıldı. Bu kuyucukların her biri PBS-Tween tampon sıvısı ile yıkandı. Bu işlem de üç defa tekrarlandı.

10. Yine kuyucuklardaki arta kalan suyu kurutmak için kuyucuklar emici havluların üzerine ters çevrilerek konuldu.
11. Her kuyucuğa 100 µl substrat ayırıcı eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
12. Üzerine her kuyucuğa aynı sırayla 100 µl sonlandırma solüsyonu eklendi.
13. Okratoksin A düzeyine karşılık gelen optik yoğunluğun standart eğrisi oluşturuldu. Numune örnekleri standart eğrisi esas alınarak ölçüldü. Numunede tespit edilen okratoksin A miktarı, standart eğrinin hazırlanması için tercih edilen en üst yoğunluktan fazla ise numune % 70 metanol ile sulandırılıp tekrar test edildi. Sonuçları hesaplarken eklenmiş çözelti faktörü göz önünde bulunduruldu.

3.2.4. Standart Eğrisinin Hazırlanmasında Kullanılan Yoğunluklar

Hesaplamalarda kullanılan standart eğrisinin hazırlanmasında 0,0-0,4 ng/ml konsantrasyon aralığı alındı ve karşılık gelen absorbansa göre eğri hazırlandı (Tablo 3. 1).

Tablo 3. 1. EIA Standart Değerler.

Standart (ng/ml)	ppb (µg/kg)
0,00	0,0
0,02	1,0
0,05	2,5
0,10	5,0
0,20	10,0
0,40	20,0

3. 2. 5. Okratoksin A Tayini İçin HPLC Cihaz ve Analiz Koşulları

Kahve örneklerinin HPLC’de analizi TUBİTAK Enstrümental Analiz Laboratuvarı tarafından gerçekleştirildi (41). EIA metodunda kullanılan eluat tercih edildi. Bu eluttan 100 µL alınarak cihaza uygulandı. Cihazın analiz koşulları aşağıdaki gibi belirlendi.

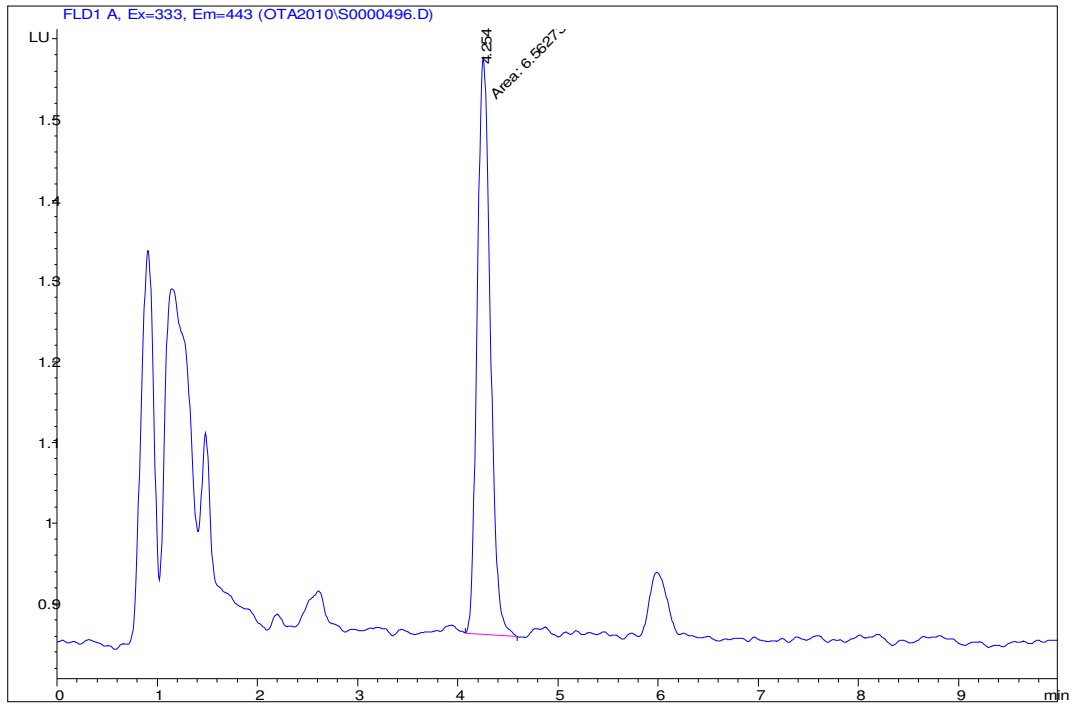
Kolon: Zorbax Eclipse XDB C18 (4, 6 x 100 x 3, 5 μ m)

Hareketli Faz: ACN: H₂O: HAc (470: 510: 20) (v: v: v)

Akış hızı: 1,0 mL/dakika

Kolon sıcaklığı: 40 °C

Floresans dedektör: Eksitasyon: 333 nm, Emisyon: 443 nm



Şekil 3. 1. Okratoksin A standardının kromatogramı.

3. 2. 6. İstatistiksel Analiz: Hesaplamalar 13,0 SPSS Windows paket programında gerçekleştirildi. Veriler aritmetik ortalama ve standart sapma olarak verildi. Her iki analiz metodu (EIA ve HPLC) arasındaki farklılıklar non-parametrik Mann-Whitney U testine göre $P < 0,05$ önemlilik derecesi esas alınarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4. 1. OKRATOKSİN A’NIN EIA ANALİZ BULGULARI

Elde edilen sonuçlardan 90 adet örneğin 70’inde (% 77,78) okratoksin A kalıntısına rastlanmadı. Toplam örneklerin 20’sinde (% 22,22) ise okratoksin A kalıntısı tespit edildi. Okratoksin A tespit edilen örneklerde ortalama OTA yoğunluğu EIA yönteminde $0,032\pm0,015$ ppb olarak bulundu.

Kahve numunelerinde bulunan en düşük okratoksin A düzeyi bu yöntemde 0,009 ppb, en yüksek okratoksin A düzeyi ise EIA’da 0,053 ppb olarak ölçüldü (Tablo 4.1). Pozitif örneklerin 2’si (% 10,0) 0-0,010; 4’ü (% 20,0) 0,011-0,020; 2’si (% 10,0) 0,021-0,030; 4’ü (% 20,0) 0,031-0,040; 5’i % 25,0) 0,041-0,050; 3’ü (% 15,0) 0,051-0,060 aralığında seyretti (Tablo 4.2).

Tablo 4. 1. Kahve örneklerindeki EIA yöntemine göre okratoksin A düzeyleri.

n	Okratoksin A (ppb)	n	Okratoksin A (ppb)
1	TED	26	TED
2	TED	27	TED
3	TED	28	TED
4	TED	29	TED
5	TED	30	TED
6	TED	31	TED
7	0,022	32	TED
8	TED	33	TED
9	0,009	34	0,022
10	0,018	35	0,048
11	TED	36	0,044
12	0,017	37	0,009
13	TED	38	0,051
14	TED	39	TED
15	TED	40	0,032
16	TED	41	0,011
17	TED	42	0,014
18	TED	43	0,035
19	TED	44	0,053
20	TED	45	0,034
21	TED	46	0,044
22	TED	47	0,051
23	TED	48	0,046
24	TED	49	0,048
25	TED	50	0,037

n: Kahve örnekleri TED: Tespit Edilemedi

Tablo 4. 1. Kahve örneklerindeki EIA yöntemine göre Okratoksin A düzeyleri (Devam).

n	Okratoksin A (ppb)	n	Okratoksin A (ppb)
51	TED	71	TED
52	TED	72	TED
53	TED	73	TED
54	TED	74	TED
55	TED	75	TED
56	TED	76	TED
57	TED	77	TED
58	TED	78	TED
59	TED	79	TED
60	TED	80	TED
61	TED	81	TED
62	TED	82	TED
63	TED	83	TED
64	TED	84	TED
65	TED	85	TED
66	TED	86	TED
67	TED	87	TED
68	TED	88	TED
69	TED	89	TED
70	TED	90	TED

Tablo 4.2. EIA ile ölçülmüş kahve örneklerindeki okratoksin A düzeyleri.

Düzy Aralıı (ppb)	Pozitif Örnek Sayısı	Rastlanma Oranı (%)	Ortalama±standart sapma (ppb)
0-0,010	2	10	0,009±0,000
0,011-0,020	4	20	0,015±0,003
0,021-0,030	2	10	0,022±0,000
0,031-0,040	4	20	0,034±0,002
0,041-0,050	5	25	0,046±0,002
0,051-0,060	3	15	0,051±0,001

4. 2. OKRATOKSİN A’NIN HPLC ANALİZ BULGULARI

Çalışmanın HPLC aşamasında kahve örneklerinde okratoksin A ile kirlenmenin boyutları TUBİTAK Ankara test ve analiz laboratuvarında belirlenerek ortaya konuldu. Elde edilen sonuçlardan 71 adet örnekte okratoksin A kalıntısına rastlanmadı. Toplam örneklerin 19’unda ise okratoksin A kalıntısı tespit edildi (Tablo 4. 3).

Bu yöntemle göre kahve numunelerindeki okratoksin A düzeyi ortalaması $0,0253 \pm 0,0167$ ppb; yöntemle analizi yapılan numunelerde en düşük okratoksin A düzeyi 0,009 ppb, en yüksek okratoksin A düzeyi ise 0,073 ppb olarak ölçüldü. Pozitif örneklerin 5’i (% 26,31) 0-0,010; 4’ü (% 21,06) 0,011-0,020; 2’si (% 10,53) 0,021-0,030; 5’i (% 26,31) 0,031-0,040; 2’si (% 10,52) 0,041-0,050; 1’i (% 5,27) 0,051-0,060 aralığında seyretti (Tablo 4.4).

Numunelerde her iki yöntemle belirlenen okratoksin A düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$) (Tablo 4.5)

Tablo 4. 3. HPLC yöntemine göre kahve örneklerindeki okratoksin A düzeyleri.

n	Okratoksin A (ppb)	n	Okratoksin A (ppb)
1	TED	26	TED
2	TED	27	TED
3	TED	28	TED
4	TED	29	TED
5	TED	30	TED
6	TED	31	TED
7	0,022	32	TED
8	TED	33	TED
9	0,009	34	0,022
10	0,018	35	TED
11	TED	36	0,044
12	0,017	37	0,009
13	TED	38	0,031
14	TED	39	TED
15	TED	40	0,032
16	TED	41	0,011
17	TED	42	0,014
18	TED	43	0,035
19	TED	44	0,010
20	TED	45	0,034
21	TED	46	0,044
22	TED	47	0,073
23	TED	48	0,010
24	TED	49	0,010
25	TED	50	0,037

Tablo 4. 3. HPLC yöntemine göre kahve örneklerindeki okratoksin A düzeyleri (Devam).

n	Okratoksin A (ppb)	n	Okratoksin A (ppb)
51	TED	71	TED
52	TED	72	TED
53	TED	73	TED
54	TED	74	TED
55	TED	75	TED
56	TED	76	TED
57	TED	77	TED
58	TED	78	TED
59	TED	79	TED
60	TED	80	TED
61	TED	81	TED
62	TED	82	TED
63	TED	83	TED
64	TED	84	TED
65	TED	85	TED
66	TED	86	TED
67	TED	87	TED
68	TED	88	TED
69	TED	89	TED
70	TED	90	TED

Tablo 4.4. HPLC ile ölçülmüş kahve örneklerindeki okratoksin A düzeyleri.

Düzy Aralığı (ppb)	Pozitif Örnek Sayısı	Rastlanma Oranı (%)	Ortalama±standart sapma (ppb)
0-0,010	5	26,31	0,009±0,000
0,011-0,020	4	21,06	0,015±0,003
0,021-0,030	2	10,53	0,022±0,000
0,031-0,040	5	26,31	0,033±0,002
0,041-0,050	2	10,52	0,044±0,000
0,051-0,060	1	5,27	0,073±0,000

Tablo 4.5. EIA ve HPLC ile ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması.

Düze y Aralı ğı (ppb)	EIA (ppb)	HPLC (ppb)	P
0-0,010	0,009±0,000	0,009±0,000	0,381
0,011-0,020	0,015±0,003	0,015±0,003	1,000
0,021-0,030	0,022±0,000	0,022±0,000	1,000
0,031-0,040	0,034±0,002	0,033±0,002	0,730
0,041-0,050	0,046±0,002	0,044±0,000	0,381
0,051-0,060	0,051±0,001	0,073±0,000	0,500
0,0-0,060 (Tüm De ğerler)	0,032±0,015	0,025±0,016	0,065

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Okratoksin mantarlardan olan *Aspergillus* ve *Penicillium*'ların birçok türü tarafından üretilebilir. Bu mantarlar her yerde bulunabilme özelliğine sahip olup genellikle gıda maddeleri ile hayvan yemlerinin kontaminasyonunda potansiyel risk teşkil etmektedirler. Yapısal olarak birbirine benzerlik gösteren okratoksin grubu bileşiklerinin en önemlisi ve en yaygın bulunanı okratoksin A'dır. Okratoksin A, bazı diğer gıdalarda olduğu kadar mısır, arpa, buğday, yulaf ve kahvede de bulunmaktadır (42).

Kahve ve diğer ürünlerde okratoksin analizleri için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. İnce tabaka kromatografisi bazı laboratuvarlarda halen kullanılan, tarama niteliğinde bir teknik olsa da, tayin limiti 5 ppb'nin üzerindedir ki bu limit okratoksinlerin kahvede bulunmasına müsaade edilen değerin (5 ppb) üzerindedir. Okratoksin, patulin ve penisillik asit gibi reaktif gruplara sahip mikotoksinler direk bağlanma reaksiyonları gösterdikleri için ELISA esaslı yöntemlerle de analizleri yapılabilmektedir (43). Okratoksinlerin numunelerden ekstraksiyonu ve analizleri için son yıllarda antikor esaslı immünoafinite kolonlarla ekstraksiyonu takiben HPLC'de floresan dedektörle analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde numunelerdeki okratoksin genellikle asetonitril:su ile ekstrakte edilip filtre kağıdından süzülmekte, ardından fosfat tamponu ile sulandırılıp immünoafinite kolonlardan geçirilmekte ve ters faz kolonlu HPLC'de

floresan dedektörde ölçümleri yapılmaktadır. Okratoksin A analizleri ile ilgili metotlarda temelde sıvı kromatografisi önerilmekte olup, ekstraksiyon aşamasında da katı-faz ekstraksiyon temizleme veya immunoaffinite kolon yaygın olarak kullanılmaktadır. Yayınlanan metotların tespit limitlerinin düşük olması ($<0,5$ ppb) ve birçok gıda ürününe başarı ile uygulanabilmesi önemli avantajlar sunmaktadır (44).

Bu çalışmada da, farklı gıda hammaddeleri, gıda ve yemlerdeki okratoksin A düzeylerinin belirlendiği farklı çalışmalarda kullanılan EIA ve HPLC yöntemleri kullanıldı. Ancak kahve örneklerindeki okratoksin A düzeyleri açısından her iki yöntemde istatistiksel olarak önemli bir farklılık ($p>0,05$) tespit edilemedi. Çalışmamızın sonuçları kahvelerde okratoksin A analizlerinde EIA tekniğinin de HPLC yöntemine benzer sonuçlar verdiğini, her iki yöntemin de kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Bu durum, yapısında reaktif gruplar bulunduran okratoksin A'nın EIA yöntemlerinde direk bağlanma reaksiyonları göstermeleri ve yöntemin hassasiyetinin yüksek olması ile açıklanabilir (43).

Kahvelerde okratoksin A düzeylerinin belirlenmesine yönelik araştırmalar bulunmaktadır: Cantafra ve ark. (45) HPLC'de ters faz kolon ve floresan dedektörle yeşil kahve numunelerinde yaptıkları analizlerde 0,4-23 ppb, Micco ve ark. (46) kahve çekirdeklerinde yaptıkları taramada numunelerin % 58'inde 0,2-15 ppb, Patel ve ark. (47) İngiltere'de 100 kahve numunesini inceledikleri çalışmalarında numunelerin 61'inde 0,1-8,0 ppb okratoksin A bulmuşlardır. Nakajima ve ark. (48) Japonya'nın Nagoya şehrinden topladıkları 47 kahve örneğinden % 30'unun 0,1-17,4 ppb aralığında OTA içerdiğini belirlemişlerdir. Trucksess ve ark. (49) çiğ kahve örneklerinde 0,1-4,6 ppb düzeyinde okratoksin A tespit etmişler, bulunan değerlerin tüketici sağlığı açısından risk oluşturmadığını bildirmişlerdir. Romani ve ark. (50) 162 çiğ kahve örneğinden 106'sında 0-48 ppb aralıklarında okratoksin A bulunduğunu, 2 numunenin 18 ve 48 ppb gibi yüksek değerlerde okratoksin A içerdiğini ifade etmişlerdir. Aynı çalışmada Afrika'dan alınan 84 yeşil kahve numunelerinin 76'sında okratoksin A bulunduğunu ve ortalama okratoksin A düzeyinin 4,7 ppb olduğu söylemişlerdir. Teixeira ve ark. (51) Brezilya'dan topladıkları 408 kahve çekirdeği numunelerinde, 135 numunenin 9'unda 5 ppb üzerinde, bir numunede 100 ppb düzeyinde okratoksin A varlığına rastlamışlardır. Urbano ve ark. (52)'nce yapılan bir taramada kahve numunelerinin % 75'inde 0,2 ppb üzerinde okratoksin A varlığı tespit edilmiş, yalnızca 1 numunenin 8,0 ppb üzerinde

okratoksin A içerdiği rapor edilmiştir. Çiğ kahvelerde okratoksin A düzeylerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir taramada yapılan araştırmada 87 numunenin % 40'ında okratoksin A tespit edilmiş, 2 numunede 5,0 ppb üzerinde (10,3 ve 14,0 ppb) okratoksin A saptanmıştır (53). Pardo ve ark., (54) kahve numunelerinde EIA ve HPLC ile okratoksin A analizleri yaptıkları çalışmada tüm numunelerin 0,6 ppb üzerinde okratoksin A içerdiğini, ortalama okratoksin A düzeyinin 6,7 ppb olduğunu belirlemişlerdir. Ülkemizde Metin (55) tez çalışması kapsamında Türkiye'nin farklı bölgelerinden tesadüf örnekleme yöntemine göre 44 adet öğütülmüş ve kavrulmuş kahve numuneleri topladığı ve EIA yöntemiyle okratoksin A miktarlarını belirlediği araştırmasında 43 adet örnekte okratoksin A tespit etmiş, 9 kahve numunesindeki okratoksin A düzeyini 2 ppb'nin üzerinde bulmuş, örneklerin okratoksin A miktarlarının 0-2,6 ppb arasında değiştiğini göstermiştir. Araştırmacı kahvenin Türkiye'ye kurutulmuş olarak geldiğini, kavurma ve öğütme işlemlerinin Türkiye'de yapıldığını belirtmiş; bu nedenle kavrulmuş ve öğütülmüş kahvelerde kontrollü depolama koşulları sağlanması ve çekirdeklere etkin kavurma işlemi uygulanmasının ülkemizde tüketilen kahvelerde küf gelişimi ve okratoksin A üretimini azaltılabileceği vurgusunu yapmıştır.

Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 90 adet kahve numunesinin EIA ve HPLC teknikleri ile karşılaştırmalı olarak okratoksin A analizlerinin yapıldığı tez çalışmamızda, EIA tekniği ile 90 adet kahve örneğinin 70'inde (% 77,78) okratoksin A kalıntısına rastlanmamış; örneklerin 20'sinde (% 22,22) okratoksin A tespit edilmiştir. okratoksin A yönünden pozitif olan örneklerde bu yöntemle göre ortalama okratoksin A değeri $0,032 \pm 0,015$ ppb olarak bulunmuştur. Kahve numunelerinde bulunan okratoksin A düzeylerinin 0,009-0,053 ppb arasında olduğu, bu örneklerin tamamında okratoksin A değerlerinin 5,0 ppb altında seyrettiği belirlenmiştir. HPLC yöntemiyle ise 71 kahve örneğinde okratoksin A kalıntısına rastlanmadığı, örneklerin 19'unda ise okratoksin A varlığı belirlenmiştir. Bu yöntemle göre kahve numunelerindeki okratoksin A düzeyi ortalamasının $0,025 \pm 0,016$ ppb; bulunan okratoksin A aralığın 0,009-0,073 ppb olduğu, EIA yönteminde olduğu gibi HPLC'de kahve numunelerinde belirlenen okratoksin A düzeylerinin 5,0 ppb altında seyrettiği gözlenmiştir.

Kahve ve kahve ürünlerinde bulunmasına müsaade edilen limitler Uluslar arası ve Ulusal kurumlarca belirlenmiştir; Ülkemizde Türk Gıda Kodeksine göre kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahvede bulunmasına müsaade edilen maksimum

okratoksin limiti 5,0 ppb; kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahvede ise 10,0 ppb olarak belirlenmiştir (39). Avrupa Birliği Resmi Gazetesinde kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahvede bulunması gereken maksimum okratoksin düzeyi 5,0 ppb; çözünebilir kahve içinse 10,0 ppb olarak bildirilmiştir (56). FAO'nun belirlediği farklı satış ürünlerindeki okratoksin A limitleri ise yeşil kahve tohumu için 8,0 ppb, kavrulmuş kahve ve kahve ürünleri için 4,0 ppb'dir (57). Tez çalışmamızdaki bulgulara ortaya konan okratoksin A değerinin Türk Gıda Kodeksinde kahvelerde bulunmasına müsaade edilen limitin (5 ppb) oldukça altında olduğu görülmektedir. Bu veriler toplanan kahve örneklerindeki okratoksin A içeriğinin tüketici sağlığı açısından risk oluşturmadığını göstermektedir. Okratoksin A ile doğal olarak kontamine olmuş farklı türlerdeki kahve çekirdeklerine az, orta ve yüksek düzeyde ısı uygulama ve kavurma yöntemlerinin, ısı derecesine paralel olarak okratoksin A'yı yıkılmadığını ve okratoksin A düzeylerinde azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Yine kahvenin kafeinsizleştirme işlemi sonrasında da okratoksin içeriğinin % 90 oranında azaldığı bildirilmektedir (44, 58).

Yeşil kahve üretiminde okratoksinlerin ana kaynakları *A. westerdijkiae*, *A. steynii* ve *A. carbonarius*'dur. Ancak bu mantar türlerinin kahve hasadı öncesi bitkide yoğun olarak bulunduğu dair bir veri bulunmamakta, bulaşmanın hasat sonrası ve kurutma aşamasında olduğu gözlenmektedir. Kahve üretimi yapılan bölgelerin genellikle tropik bölgeler olması nedeniyle, kahve hasat sonrasında nemli ve yağmurlu ortamlarda bulunmakta, kurumasi uzun zaman almakta ve sonuç olarak mantarların okratoksin üretimine uygun bir ortam oluşmaktadır. Fakat kahveye iyi kurutma ve işleme metotları uygulandığında okratoksin riski azaltılabilmektedir (44).

Farklı bölgelerden toplanan kahve numunelerindeki düşük okratoksin A içeriği, ülkemize kurutulmuş olarak gelen kahvenin uygun kavurma ve öğütme işlemlerine tabi tutulması, özellikle Türk kahvesi hazırlanışındaki yoğun kavurma işlemi sonrasında okratoksin A'nın azalması, kahvenin genellikle günlük olarak öğütülüp satılması ve uygun saklama koşullarında muhafaza edilmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

okratoksin A başlıca böbrekleri etkileyen bir toksindir. Hayvanlarda yapılan 90 günlük yedirme denemelerinde okratoksin A'nın böbrek fonksiyonu üzerindeki artan etkileri ile uzun süreli maruz kalma sonucunda böbrekte hasar gözlemlenmiştir. okratoksin A'nın yaptığı renal lezyonlar, proksimal tubülün dejenerasyonu, renal kortekste interstisyel

fibrozis, glomerülün hiyalinizasyonu ve tübüler epitelin atrofi ile karakterizedir. okratoksin A böbrek hücrelerinde belli bölgeleri etkileyerek apoptotik tipte oluşumlara sebep olur. Yapılan çalışmalarda okratoksin A'nın farelerde, sıçanlarda ve tavuklarda güçlü bir teratojen olduğu anlaşılmıştır. Merkezi sinir sistemi en hassas odaklardan biridir ve ilk organ oluşumu döneminde okratoksin A, DNA kırılmaları, protein sentezi inhibisyonu ve glikoneojenez; mitokondride oksidatif fosforilasyonun ve kan pıhtılaşma mekanizmasının bozulmasına sebep olmasıyla insan sağlığı açısından büyük risk taşımaktadır. Öldürücü dozun alımıyla karaciğer hücrelerinde pek çok patolojik değişiklik söz konusu olmaktadır. okratoksin A'nın temel toksik etki mekanizması, ATP azalmasına bağlı olarak mitokondriyel solunumun inhibisyonu, protein sentezinin azalmasına eşlik eden tRNA sentezinin inhibisyonu ve LPO'nun artması şeklinde tanımlanmaktadır. Okratoksin A'nın oksidatif stresi indüklediği bilinmektedir. Zira reaktif oksijen bileşiklerinin (ROB) oluşumu Fe^{+3} -OTA kompleksi aracılığıyla olmaktadır. Okratoksin A, LPO ve aynı zamanda hücrel hasar göstergesi olan malondialdehit (MDA) artışına sebep olmaktadır. Serbest radikal düzeyleri, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimler aracılığıyla kontrol edilmektedir. Antioksidan savunma azaldığında veya ROB düzeyi arttığında oksidatif stres gelişir. Protein sentezinin inhibisyonu ve oksidatif yolak aracılığıyla serbest radikallerin oluşumu okratoksin A'nın toksik etkisinde anahtar rolü üstlenmektedir. Okratoksin A, fenilalanin-tRNA sentetaz tarafından katalizlenen reaksiyonda fenil alanin ile yarışarak protein sentezini inhibe eder ve bu özellik zehirlilikle ilişkilidir. Okratoksin A'nın insanlarda immünoşüpresif, hepatotoksik, nefrotoksik, teratojenik, apoptoz indükleyicisi, genotoksik ve lipid peroksidasyonu (LPO) uyarıcı etkilerinin olabileceği belirtilmektedir. Okratoksin A, IARC tarafından "Grup IIB" muhtemel karsinojen olarak sınıflandırılmıştır. Okratoksin A dolaylı karsinojen mekanizması aracılığıyla epigenetik karsinojen olarak da adlandırılmaktadır. Ancak aynı zamanda DNA'ya doğrudan bağlanabilmesi nedeniyle doğrudan karsinojen olarak da kabul edilmektedir (58, 59). Araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre bu tez projesi ile nefrotoksik, hepatotoksik, embriyotoksik, teratojenik, karsinojenik, ve immünoşüpresif özelliklere sahip olan okratoksin A'nın öğütülmüş kahvelerdeki, ortalama okratoksin A (0,036 µg/kg) düzeyinin yasal limitin (5 µg/kg) altında olduğu görülmüştür.

Dünyada ve Türkiye’de gıdalarda mikotoksinlerin kontrolü ve denetimleri ile ilgili birçok yasal düzenleme yapılmıştır. Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Avrupa Birliği (EU) ve Ulusal örgütler mikotoksinlerin gıdalarda bulunmasına izin verilen sınırları belirlemişlerdir. Ülkemizde de Tarım Bakanlığı tarafından hazırlanan ve 2008 yılında güncellenen Türk Gıda Kodeksinde mikotoksinlerle ilgili yasal limitler verilmiş; gıdalarda mikotoksin oluşumlarının önlenmesi için de çeşitli yönetmelikler hazırlanmıştır. Gıdaların ve paketleme materyallerinin pazar denetimine ilişkin bir yönetmelik 2005 yılının Mart ayında yürürlüğe girmiştir fakat bu yönetmelik AB müktesebatıyla tam anlamıyla uyumlu değildir. Bazı aflatoksin ve okratoksin tipleri için birkaç kontrol laboratuvarı Türk akreditasyon kurumundan akreditasyon almıştır. AB uygulamalarına uygun olması amacıyla fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik analiz metotları il denetim laboratuvarlarında standardize edilmiştir. 2005 yılında gıdalarda okratoksin A düzeyi ile ilgili resmi denetimlerde kullanılacak örnekleme metotlarına yönelik bir Resmi Tebliğ yayımlanmıştır. Avrupa Birliği uyum yasaları çerçevesinde Ülkemizde gıdalarda mikotoksin kalıntılarının belirleneceği akredite laboratuvarlar kurulmuştur (60).

Sonuç olarak elde edilen kahve numunelerinde gerçekleştirilen analizleri takiben bazı örneklerde okratoksin A kalıntısına rastlanmazken bazı örneklerde ise tolerans limitlerinin altında (<5,0 ppb) okratoksin A kalıntısı tespit edilmiştir. Her ne kadar sınırlı sayıda örnekte analiz gerçekleştirilmiş olsa da; bu sonuçlar, Türkiye’de tüketime sunulan kahvelerde bahse konu mikotoksin yönünden bir risk olmayabileceğine ışık tutması açısından önemlidir.

Fakat ülkemizde kahvelerde okratoksin A ile ilgili tarama çalışmalarının yetersizliği nedeniyle tüketime sunulan kahvelerde her zaman okratoksin A riskinin olabileceği de göz ardı edilmemelidir. Dolayısıyla bu ürünlerde muhtemel okratoksin A kalıntısının önlenmesi için yurtdışından ithal edilen işlenmemiş kahve çekirdeklerinin bu mikotoksin yönünden Resmi kurumlarca düzenli olarak denetimlerinin yapılması gereklidir. Kahvenin kavurma ve öğütülme aşamalarında küf kontaminasyonunun engellenmesi veya en aza indirilmesine katkıda bulunacak teknolojilerin kullanılması da izlenecek diğer yöntemler arasında yer alır.

6. KAYNAKLAR

1. Duris, D. Coffee and Ochratoxin Contamination. Food Safety Management in Developing Countries. Proceedings of the International Workshop, 1-5.
2. Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. Int J Food Microbiol 2007; 119: 3-10.
3. Leung MC, Díaz-Llano G, Smith TK Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. J Agric Food Chem 2006; 54: 9623-9635.
4. Pitt JI. Toxigenic fungi and mycotoxins. Br Med Bull 2000; 56: 184-192.
5. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 497-516.
6. Bräse S, Encinas A, Keck J, Nising CF. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. Chem Rev 2009; 109: 3903-3990.
7. Petzinger E, Ziegler K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. J Vet Pharmacol Ther 2000; 23: 91-98.
8. Bucheli P, Taniwaki MH. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. Food Addit Contam 2002; 19: 655-665.
9. Mantle, P.G. Risk assessment and the importance of ochratoxins. Int Biodeter Biodegr 2002; 50: 143-146.

10. Amézqueta S, González-Peñas E, Murillo-Arbizu M, Cerain Adela López de. Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* 2009; 20: 326-333.
11. Moss M.O., Mycotoxin review–1. *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist* 2002; 16: 116-119.
12. Marquardt RR, Frohlich AA. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J Anim Sci* 1992; 70: 3968-3988.
13. Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem Biol Interact* 2006; 159: 18-46.
14. Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal Bioanal Chem* 2009; 395: 1225-1242.
15. Dietrich DR, Heussner AH, O'Brien E. Ochratoxin A: comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). *Food Addit Contam* 2005; 22: 45-52.
16. Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 61-99.
17. Manderville RA. A case for the genotoxicity of ochratoxin A by bioactivation and covalent DNA adduction. *Chem Res Toxicol* 2005; 18: 1091-1097.
18. Rumora L, Grubisić TZ. A journey through mitogen-activated protein kinase and ochratoxin A interactions. *Arh Hig Rada Toksikol* 2009; 60: 449-456.
19. Schilter B, Marin-Kuan M, Delatour T, Nestler S, Mantle P, Cavin C. Ochratoxin A: potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity. *Food Addit Contam* 2005; 1: 88-93.
20. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 2001; 167: 101-134.
21. Sharma RP. Immunotoxicity of mycotoxins. *J Dairy Sci* 1993; 76: 892-897.
22. Al-Anati L, Petzinger E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *J Vet Pharmacol Ther* 2006; 29: 79-90.
23. Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ* 1999; 77: 754-766.

24. Peraica M, Domijan AM, Miletić-Medved M, Fuchs R. The involvement of mycotoxins in the development of endemic nephropathy. *Wien Klin Wochenschr* 2008; 120: 402-407.
25. Schatzmayr G, Zehner F, Täubel M, Schatzmayr D, Klimitsch A, Loibner AP, Binder EM. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50: 543-551.
26. Speijers GJ, Speijers MH. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol Lett* 2004; 153: 91-98.
27. Scott PM. Biomarkers of human exposure to ochratoxin A. *Food Addit Contam* 2005; 1: 99-107.
28. Van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389: 147-157.
29. Sforza S, Dall'asta C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2006; 25: 54-76.
30. Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal Chim Acta* 2009; 632: 168-180.
31. Sizoo EA, Van Egmond HP. Analysis of duplicate 24-hour diet samples for aflatoxin B1, aflatoxin M1 and ochratoxin A. *Food Addit Contam* 2005; 22: 163-172.
32. Monbaliu S, Van Poucke C, Van Peteghem C, Van Poucke K, Heungens K, De Saeger S. Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009; 23: 3-11.
33. Duarte SC, Pena A, Lino CM. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiol* 2010; 27: 187-198.
34. Anli E, Alkis İM. Ochratoxin A and Brewing Technology: A review. *J Inst Brew* 2010; 116: 23-32.
35. Bata Á, Lásztity R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci Tech* 1999; 10: 223-228.

36. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 2002; 127: 19-28.
37. Bullerman LB, Bianchini. A Stability of mycotoxins during food processing. *Int J Food Microbiol* 2007; 119: 140-146.
38. FAO. Reducing ochratoxin A in coffee. Erişim: [<http://www.coffee-ota.org/faq.asp>], Erişim Tarihi: 25.Ocak.2011.
39. Türk Gıda Kodeksi. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, Tarih: 17.05.2008- 26879, Tebliğ No: 2008/26.
40. Helica Biosystems, Quantitative Assay for Ochratoxin A in Coffee, Cocoa, and Spices (CAT No: 96OCH01COF), 2010.
41. Anon. TUBİTAK Enstrümental Analiz Laboratuvarı, Ankara.
42. Anon. Ochratoxin. Erişim: [<http://www.food-info.net/uk/tox/ochra.htm>], Erişim Tarihi: 25.Ocak.2011.
43. Var I, Kabak B. Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines. *Microchemical J* 2007; 86: 241-247.
44. Benford D, Boyle C, Dekant W, Fuchs R, Gaylor DW, Hard G, McGregor D, Pitt J, Plestina R, Shephard G, Solfrizzo M, Verger P, Walker R (2004). Ochratoxin, Erişim: [<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>], Erişim Tarihi: 25.Ocak.2011.
45. Cantafora A, Grossi M, Miraglia M, Benelli L. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. *Riv Soc Ital Sci Aliment* 1983; 12: 103-108.
46. Micco M, Grossi M, Miraglia M, Brera C. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Addit Contam* 1989; 1-6: 333-339.
47. Patel S, Hazel CM, Wİnterton AGM, Gleadle AE. Survey of the ochratoxin A in UK retail coffees. *Food Addit Contam* 1997; 3: 217-222.
48. Nakajİma M, Tsubouchİ H, Mİdyabe M, Ueno Y. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food Agr Immunol* 1987; 9: 77-83.
49. Trucksess MW, Giler J, Young K, White KD, Page SW. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee. *AOAC Intenational* 1999; 82: 85-89.

50. Romani S, Sacchetti G, Lopez CC, Pinnavaia GG, Rosa MD. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. *J Agr Food Chem* 2000; 48: 3616-3619.
51. Teixeira AA, Taniwaki MH, Pitt JI, Iamanaka BT, Martins CP.. The presence of ochratoxin A in coffee due to local conditions and processing in four regions of Brazil. 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 2001.
52. Urbano GR, Taniwaki MH, Leita FMF, Vincentini MC. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. *Food Protection* 2001; 64: 1226-1230.
53. Sommerfeld G, Gabel B. Studies on the sample weight for ochratoxin A determination in raw coffee. *Eur Food Technol* 2002; 215: 520-522.
54. Pardo E, Marin S, Ramos A, Sanchis V. Occurrence of Ochratoxigenic fungi and Ochratoxin A in green coffee from different origins. *Food Sci Tech Int* 2004b; 10: 45-55.
55. Metin R. Türk kahvesi örneklerinde okratoksin A varlığı. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, 2006.
56. Official Journal of the European Union. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, The Commission of The European Communities (Text with EEA relevance), 2006.
57. Girgin G, Başaran N, Şahin G. Dünyada ve Türkiye’de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2001; 58: 97-118.
58. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2008; 28: 63-92.
59. Anon. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Konya İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Mikotoksinlerin İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerindeki Etkileri. Erişim: [http://42kontrollab.kkgm.gov.tr/index_dosyalar/page0025.htm], Erişim Tarihi: 20.Ocak.2011.
60. Şentürk M.U. Avrupa Birliği Ortak Tarım Politikaları ve Türkiye, Yüksek Lisans Tezi, Bahçeşehir Üniversitesi Sosyal Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2007.

ÖZGEÇMİŞ

Betül AKÇAGEDİK 1985 yılında Yozgat ‘da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini 2000 yılında tamamladı. 2001 yılında girdiği Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Eğitimine başladı. Halen, Yozgat Tarım İl Müdürlüğü’nde Targel Projesi kapsamında Veteriner Hekim olarak çalışmaktadır.