

BATI AKDENİZ BÖLGESİNDE TÜKETİLEN ŞARAPLARDA OKRATOKSİN A VARLIĞI

MERVE ÇİÇEK



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BATI AKDENİZ BÖLGESİNDE TÜKETİLEN
ŞARAPLARDA OKRATOKSİN A VARLIĞI

MERVE ÇİÇEK

DANIŞMAN:
YRD. DOÇ. DR. AYŞE GÜL MUTLU

MART, 2012
BURDUR

BATI AKDENİZ BÖLGESİNDE TÜKETİLEN ŞARAPLARDA OKRATOKSİN A VARLIĞI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Merve ÇİÇEK

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU

MART, 2012

BURDUR



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Merve ÇİÇEK tarafından Yrd. Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU yönetiminde hazırlanan “Batı Akdeniz Bölgesi’nde Tüketilen Şaraplarda Okratoksin A Varlığı” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 15/03/2012

Yrd. Doç. Dr. Oğuz GÜRSOY
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Başkan

Yrd. Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Özen KURŞUN
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ekrem ÇİÇEK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikotoksinler	1
1.2. Okratoksin A'nın Yapısı ve Özellikleri	3
1.3. Okratoksin A Üretebilen Funguslar	6
1.4. Okratoksin A'nın İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	7
1.5. Şarap ve Okratoksin A	12
1.6. Şarapta Okratoksin A Limitleri ve Şarapta Okratoksin A Varlığının Engellenmesi	15
2. MATERYAL ve YÖNTEM	17
2.1. Materyal	17
2.2. Yöntem	18
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	22
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	27
5. KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	33

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BATI AKDENİZ BÖLGESİNDE TÜKETİLEN ŞARAPLARDA OKRATOKSİN A VARLIĞI

Merve ÇİÇEK
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Mikotoksinler çeşitli bitkisel ve hayvansal orijinli gıdalarda yaygın olarak bulunmakta ve bitkisel ürünlerde mikotoksinlerle kontaminasyon hasat öncesi veya hasat sonrası olabilmektedir. Meyveler olgunlaşma aşamasında, dokularda pH'nın yükselmeye başlaması, koruyucu tabakanın yumuşaması ve meyvenin savunma mekanizmasının zayıflamasıyla birlikte fungal saldırıya karşı hassas hale gelmektedir. Üzüm sularında ve şarapta ise sorun yaratan en önemli mikotoksin *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen okratoksin A'dır ve nefrotoksik ve karsinojenik aktiviteye sahip olması sebebiyle oldukça önemlidir.

Bu tez çalışması, Batı Akdeniz bölgesi'nde tüketilen şaraplarda okratoksin A'nın hangi miktarlarda bulunduğunu göstermeyi amaçlamaktadır. Tez çalışması için 36 adet şarap örneği, Batı Akdeniz Bölgesi'nde tüketilen şarap çeşitlerinden ve ev şaraplarından seçildi. Farklı üzüm çeşitleri kullanılarak farklı üretim tesislerinde üretilen bu şaraplarda, Enzim Bağlı İmmunosorbent (ELISA) yöntemi ile okratoksin A seviyeleri tespit edildi. Araştırma sonucunda 33 şarap örneğinde okratoksin A bulgusuna rastlandı. Beyaz şaraplarda ortalama 0,15 ppb; pembe şaraplarda 0,14 ppb; kırmızı şaraplarda 0,14 ppb ve ev şaraplarında 0,13 ppb seviyelerinde okratoksin A tespit edildi. Türkiye Cumhuriyeti Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yayımlanan, Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkındaki Tebliğ'de, şaraplarda okratoksin A bulunabilme üst sınırı 2 ppb olarak belirtilmiştir. Analiz ettiğimiz örneklerin hiçbiri bu üst sınırı aşmamıştır.

Anahtar kelimeler: Okratoksin A, Şarap, Mikotoksin, Batı Akdeniz

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Hazırlanan bu yüksek lisans tezi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından 0140-NAP-11 no'lu projeden desteklenmiştir.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

OCHRATOXIN A LEVELS of WINES CONSUMED in WEST MEDITERRANEAN REGION of TURKEY

Merve ÇİÇEK
Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Mycotoxins commonly exist in variety of food, plant or animal origin. Mycotoxin contamination may occur before or after harvest in plant products. Fruits get sensitive against fungal attack due to pH increase in tissue, softening of protective layer and weakening of defense mechanism during maturation. The most important mycotoxin that causes problem in grape juices and wines is ochratoxin A. Among the mycotoxins which gets produced by *Aspergillus* and *Penicillium* molds, ochratoxin A is quite important due to its nephrotoxic and carcinogenic activity.

Objective of this thesis study is to show ochratoxin A levels in wines consumed in West Mediterranean region of Turkey. For this thesis study, 36 wine samples were collected from the most consumed wine selections in the West Mediterranean and house made wines. Ochratoxin A levels were detected in these wine samples, which were produced in different production facilities, using different grape types, by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test. As the conclusion of this study, ochratoxin A was detected in 33 wine samples. Ochratoxin A levels were; 0,15 ppb in white wines, 0,14 ppb in pink wines, 0,14 ppb in red wines and 0,13 ppb in house made wines. "Turkish Republic Ministry of Food, Agriculture and Livestock" has set the upper limit of ochratoxin A level at Turkish Food Codex's Edict about Maximum Limits of Propagators in Foodstuffs as 2 ppb. None of the samples we analyzed exceeded this upper limit.

Keywords: Ochratoxin A, Wine, Mycotoxin, West Mediterranean

Advisor: Assist. Prof. Dr. Ayşe Gül Mutlu, Mehmet Akif Ersoy University, Department of Biology

The present M.Sc. thesis was supported by Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Project Commission under the project no of 0140-NAP-11.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılması ve tezin yazılması dışında gerek dersler gerekse yaşam konusunda her zaman destek olan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU'ya; yine eğitim, laboratuvar, cihaz gereksinimlerinin karşılanması ve bana hayatımın her aşamasında destek olan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Özen Kurşun'a, örneklerimizin analizi sırasında desteklerini esirgemeyen hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Tamer ALBAYRAK'a, teze ve eğitim öğrenimime yaptığı tüm katkılardan dolayı hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuz GÜRSOY'a ve hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İsmail KAYAĞİL'e; maddi ve manevi açıdan her türlü desteğini esirgemeyen sevgili aileme, manevi desteğinin yanında, fiili yardımlarıyla tez çalışmasını destekleyen arkadaşım Hakan BOYACIOĞLU'na; değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Sadık ÇOĞAL, Araş. Gör. Muzaffer DÜKEL, Araş. Gör. Alper Yener YAVUZ, Hülya UYSAL, Mustafa ÖZEL ve Araş. Gör. Duygu Ceren ÇAĞLAN'a; maddi destek sağlayan Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür eder, saygılar sunarım.

Merve ÇİÇEK
BURDUR, 2012

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2. Okratoksin A'nın kristal yapısı elektron mikroskop görüntüsü.....	4
Şekil 3. Sekizinci basamağın uygulanması sonrası renk değişimi.....	20
Şekil 4. Onbirinci basamak sonrası renk değişimi.....	20
Şekil 5. Standart eğri.....	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1. Batı Akdeniz Bölgesi'nden alınan 36 adet farklı şarap örneği.....	17
Çizelge 2. Örneklerin etiket bilgileri ve okratoksin A miktarları.....	22
Çizelge 3. Renklerine göre şarapların ortalama okratoksin A miktarlarının.....	24
karşılaştırılması	
Çizelge 4. Üretim şekillerine göre şarapların okratoksin A miktarlarının	24
karşılaştırılması	
Çizelge 5. Üzüm çeşidine göre örneklerin okratoksin A miktarlarının.....	25
kıyaslanması	
Çizelge 6. İki veya daha fazla üzüm çeşidinin karıştırılmasıyla elde edilen.....	26
örneklerin okratoksin A miktarlarının kıyaslanması	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

OTA Okratoksin A

TLA Tespit edilebilir limitin altında

1. GİRİŞ

1.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium* ve *Fusarium* türleri tarafından üretilen, hayvanlar ve insanlar üzerinde toksik etkileri olan ikincil metabolitlerdir (Peraica ve diğ., 1999; Creppy, 2002; Petzinger ve Weidenbach, 2002). Başlıca mikotoksin üreten türler ve ürettikleri toksinler; aflatoksinler (*Aspergillus*), okratoksinler (*Aspergillus* ve *Penicillium*), trikotesenler (*Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Myrothecium*), fumanisinler (*Fusarium moniliforme*), ergot alkaloidleri (*Claviceps*, *Neophytodium*), zearalenonlar (*Fusarium graminearum*) ve sitrinin (*Penicillium citrinum*, *P. veridicatum*) olarak bilinmektedir (Berndt ve diğ., 1980; Peraica ve diğ., 1999; Bryden, 2007; Shepard, 2008). Mikotoksinler, nispeten hafif molekül ağırlıklı organik bileşiklerdir ve kimyasal yapıları oldukça değişkendir (Peraica ve diğ., 1999). Gıdalarda bulunurlar ve ısıya dayanıklıdırlar; normal endüstriyel işlemlerle ya da pişirme ile yok edilemezler (Creppy, 2002).

Mikotoksinlere maruz kalma sonucu oluşan hastalığa mikotoksikoz denir (Bryden, 2007). Mikotoksikoz, mikotoksinlerin insanlar ve hayvanlar üzerindeki toksik etkisi sonucu oluşur ve bu mikotoksinin toksisitesine, maruz kalma derecesine, bireyin yaş ve beslenme durumuna, bireyin maruz kaldığı diğer kimyasallarla toksinin sinerjik etkileşimine bağlı bir durumdur (Peraica ve diğ., 1999).

Mikotoksinler dört temel toksik etkiye sahiptirler. Bunlar; akut, kronik, mutajenik ve teratojenik etkilerdir. Akut mikotoksikoz, büyük oranda ölümle sonuçlanan karaciğer ya da böbrek fonksiyonları hasarı yapabilir. Bunun yanında bazı mikotoksinler protein sentezini etkiler, bunun sonucu olarak nekroza veya cilt hassasiyetine sebep olur; ayrıca yüksek dozları beyin fonksiyonlarını etkiler. Birçok mikotoksinin kronik etkileri kanseri, ağırlıklı olarak karaciğer kanserini tetiklemektedir. Bazı toksinler DNA replikasyonunu tetikler ve böylece mutajenik ve teratojenik etki gösterebilir (Pitt, 2000). Mikotoksinler antijenik değildir fakat bir antikor, bir protein ya da polipeptit taşıyıcıyla konjugasyonu sonrası, toksine cevap oluşturabilir (Bryden, 2007).

Mikotoksinlerin toksik etkileri toksinin kimyasal yapısına bağlıdır. Bu yan etkinin derecesi sadece gıdalarda ve diyetlerde bulunma miktarıyla değil aynı zamanda maruz kalma süresi ile de alakalıdır. Esas olarak mikotoksin üretimi, ve dolayısıyla yemeklerin ve gıdaların kontaminasyon dereceleri; substrat kompozisyonu ve yapısı, nem ve sıcaklık gibi faktörler değiştirilerek azaltılabilir. Mikotoksinlerin küfler tarafından sentezi genetik olarak düzenlenir ve aminoasit ve yağ asidi metabolizması ile yakından ilişkilidir (Fink-Gremmels, 1999).

Bu mikotoksinlerden; fumanisinler ve aflatoksinler karsinojenik; okratoksin A (OTA) nefrotoksik, immunosupresif, karsinojenik ve teratojenik; zearalenonlar östrojenik; trikotesenler sitotoksik, immunosupresif; sitrinin nefrotoksik etki gösterir. (Berndt,1980; Fink-Gremmels, 1999; Peraica ve diğ., 1999; Pitt, 2000; Bryden, 2007).

Çalışma alanlarında en sık karşılaşılan toksin, bir tip B trikotesen olan DON (deoksinivalenol)'dur (Creppy, 2002; Bryden, 2007). Çoğunlukla *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* türleri tarafından üretilen toksin; buğday, arpa, mısır, yulaf, pirinç ve çavdar gibi gıdalarda bulunabilir. Kanserojen olmayan toksinin insanlar üzerinde akut, kısa zamanlı, uzun zamanlı etkileri olabilir ve akut etkisi sonucu kusma veya anoreksi görülebilir (Creppy, 2002).

Fumanisinler, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium moniliforme* ve *Fusarium proliferatum* türleri tarafından üretilen, kuşkonmaz, pirinç, bira, fasulye gibi gıdalarda bulunan mikotoksinlerdir ve propan-1,2,3,-trikarboksilikasit'in diesteridir. Karaciğer ve böbrek tümörlerine neden olabilir ayrıca biyokimyasal mekanizmalara ve hücrel regülasyonlara etki edebilir (Creppy, 2002). Aynı zamanda *in vivo* deneylerde fumanisin B1'in beyin lezyonlarına yol açtığı tespit edilmiştir (Creppy ve diğ., 2004).

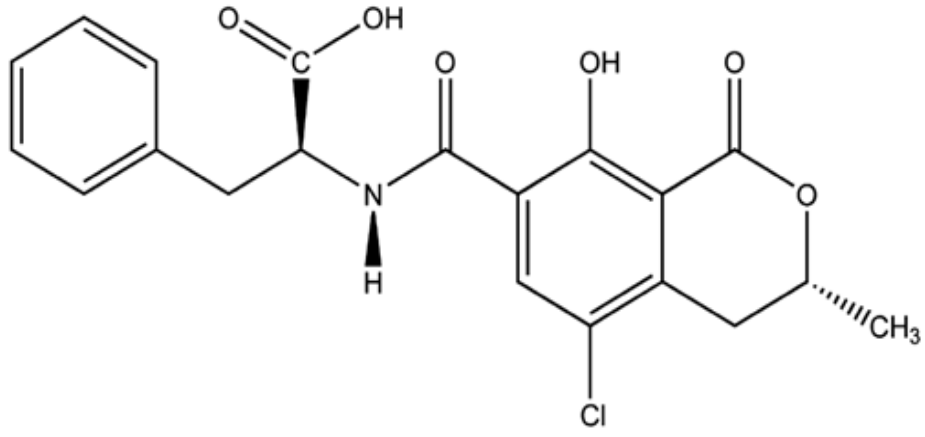
Zearalenonlar yarışmalı bir şekilde östrojen reseptörlerine bağlanarak toksik etkilerini gösterirler ve akut-kronik toksisite, karsinojenite, genotoksisite, DNA hasarı oluşumları, immunotoksisite, geridönüşümlü ve gelişimsel toksisite gösterirler (Creppy, 2002).

Aflatoksinler, bitki ve bitki ürünlerini kontamine eden *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve nadiren *Aspergillus nomius* türleri tarafından üretilen, yemlerde, fıstıkta, mısır gibi gıdalarda bulunabilen mikotoksinlerdir. Aflatoksin B1 memelilerde bilinen en potansiyel hepatokarsinojen maddedir (Creppy, 2002).

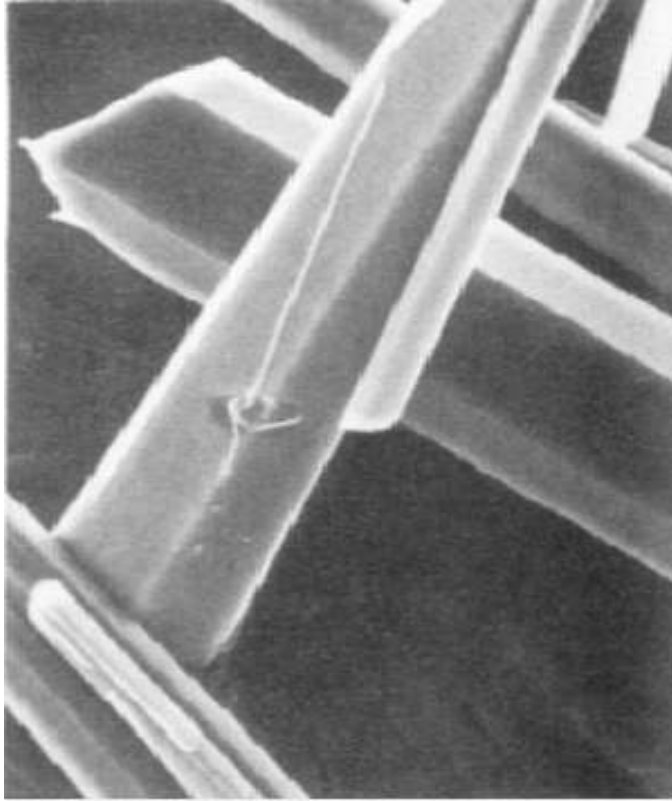
Fungusların gıdalarda bulunduğu ve mikotoksin adı verilen toksinleri ürettikleri 1960'lerden bu yana bilinmektedir. Bu toksinler geçmişte insanlarda ve hayvanlarda birçok salgın hastalığa sebep olmuşlardır. En önemlileri alimantar toksik aleukia (ATA), ergotizm, stachybotryotoksikoz, aflatoksikozdur (Pitt, 2000). Orta çağda, *Claviceps purpurea* türünün ürettiği ergot alkaloidlerinin sebep olduğu bir mikotoksikoz olan ergotizmden binlerce insan ölmüş ya da sakat kalmıştır. Ergotizm (St Anthony's fire) kurbanı hastalar, ergot ile kontamine olmuş buğday ve çavdar ile yapılan ekmeğin pişirilmesi sırasında oluşan, halusinasyon yapan bir madde olan liserjik asit dietilamid (LSD)'e; buna ek olarak mandragora elmasından belladonna alkaloidlerine maruz kalmışlardır (Peraica ve diğ., 1999; Shephard, 2008). Ergot alkaloidleri günümüzde; parkinson tedavisinde prolaktin inhibitörü olarak, serebrovasküler yetersizlik, migren tedavisi, venöz yetersizlik, tromboz ve embolizmde serebral ve periferik metabolizmayı uyarmak için ve rahim uyarılarında, dopaminerjik agonist olarak kullanılmaktadır (Peraica ve diğ., 1999). Bunun yanı sıra İkinci Dünya Savaşı sırasında Sovyetler Birliği'nde hububatın bir kış fazla tarlada beklemesi sonucu, hemorajik sendrom olarak bilinen ve binlerce insanın ölümüne sebep olan, *Fusarium sporotricoides* türünün ürettiği, bir trikotesen olan T-2 toksininin sebep olduğu alimentary toksik aleukia (ATA) hastalığı görülmüştür. 1960 yılında aflatoksinler izole edilmiş, insan sağlığına zararlı etkileri olduğu keşfedilmiştir (Peraica, 1999; Shephard, 2008).

1.2. Okratoksin A'nın Yapısı ve Özellikleri

OTA, (R)-N-[(5kloro-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-metil-1okzo-1H-2-benzopiran-7-yl)-karbonil]-L-fenilalanin, dihidroizokumarin halkasına amid bağı üzerinden bağlı L-β-fenilalanin molekülünden oluşur (Şekil 1). OTA, renksiz kristal yapıda bir bileşiktir (Şekil 2) ve polar organik çözücülerde ve seyreltilmiş sulu bikarbonat çözeltisinde çözünebilir. Suda çözünürlüğü ise azdır (Xiao, 1995; Valenta, 1998).



Şekil 1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı (Pohland ve diğ., 1992)



Şekil 2. Okratoksin A'nın kristal yapısı elektron mikroskop görüntüsü (Xiao, 1995).

OTA; hububat, bira, kahve, şarap ve hayvan orjinli gıdaları kontamine eden yaygın bir mikotoksindir (Coronel ve diğ., 2010).

Puntarić ve diğ. (2001), Slovenya'nın Slavonski Brod, Osijek, Hrvatsko Zagorje, Istria ve Celje bölgelerinde yaptıkları araştırmada, buğday ve mısırdaki bulunan OTA seviyelerini tespit etmişlerdir. Doksan iki adet buğday örneğinin 74 adedinde 0,02-160 g/kg arası değerlerde ve 51 mısır örneğinin 17 adedinde 0,02-40 g/kg arası değerlerde OTA bulunmuştur. Slavonski Brod bölgesinden alınan buğday örneklerinde en yüksek OTA seviyesini tespit etmişlerdir (38,8-27,2 g/kg). Hemen arkasından Osijek bölgesi'nde ikinci yüksek seviye tespit edilmiştir (8,7-8,3 g/kg). Celje bölgesinde ise en düşük OTA seviyelerini kaydetmişlerdir (0,2-0,5 g/kg). Mısırdaki ise en yüksek OTA seviyesi Slavonski Brod bölgesinde (20-14,8 g/kg), en düşük OTA seviyesi ise Istria bölgesinde (0,4-0,8 g/kg) tespit edilmiştir. Slavonski Brod bölgesinde diğer bölgelere nazaran hem mısırdaki hem de buğdayda daha yüksek değerler elde edilmesi, endemik nefropati bölgesi olan Slavonski Brod için doğal olmasına karşın, endemik nefropati bölgesi olmayan, diğerlerine nazaran nispeten yüksek OTA seviyeleri tespit edilen Osijek bölgesinde de ara sıra görülen hastalıklar tespit edilmeye başlanmıştır (Puntarić ve diğ., 2001).

OTA, yapısal olarak doğal floresans ve optik aktivite gösterir (Dall'Asta ve diğ., 2004). Dall'Asta ve diğ. (2004), şaraplarda OTA belirleme çalışmalarını farklı pH değerlerinde yürütmüşler ve alkali çözeltide 10 kat daha fazla floresans özelliği gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda sonuçlar OTA'nın termal ve hidrolitik stabilitesini göstermektedir (Pohland ve diğ., 1992). OTA'nın karanlıkta 4-28°C'de bir hafta saklandığında stabil kaldığı belirlenmiştir. On iki hafta sonunda toksinin %45'i örneklerden geri alınabilir durumda bulunmuştur. OTA kontamine ürünlerin 3 saat otoklavlanması bile toksini tam olarak yok edememiştir. Buna rağmen saf OTA ışığa hassastır (Trenk ve diğ., 1971).

OTA gıdalarda; analitik metotlar, ince tabaka kromatografisi, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), immunokimyasal yöntemler (ELISA, enzyme linked immunosorbent assay), gaz kromatografisi kütle spektrumu (GC-MS) gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilir (Pohland ve diğ., 1992; Flajs, 2009).

1.3. Okratoksin A Üretebilen Funguslar

OTA, esas olarak *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin sekonder metaboliti olarak bilinmektedir (Stander ve Steyn, 2002). OTA ürettiği bilinen funguslar; *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. auricomus*, *A. ostinaus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. sulfureus*, *A. alliaceus*, *A. albertensis*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. glaucus* ve *Penicillium verrucosum*'dur (Bayman ve diğ., 2002). *Penicillium verrucosum* Kanada ve Avrupa'da serin bölgelerde (30°C ve daha düşük sıcaklıklarda) tahıl ve tahıl ürünlerinde OTA kaynağıdır (Creppy, 2002).

Cabañes ve diğ. (2002), yaptıkları çalışmada, küflü üzümle mikro düzeyde şarap üretmişler ve OTA kontaminasyonunun hangi mikroorganizmadan kaynaklandığını test etmişlerdir. Çalışmada sadece *Aspergillus carbonarius* türünün OTA ürettiği tespit edilmiştir.

Siyah Aspergilli (Black Aspergilli, siyah sporlar), üzümle ve kuru üzümde predominant mikrobiyota olarak rapor edilmiştir. Siyah Aspergilli üzüm gelişiminin her evresinde izole edilebilir fakat en yüksek seviyelere hasat zamanında ulaşılmaktadır. Sporlarının siyah olması, güneş ışığı ve UV ışıktan koruma sağlar böylece habitatlarda yarışmalı avantaj elde eder (Esteban ve diğ., 2004).

Luchetta ve diğ. (2010), İtalya'da yaptıkları çalışmada, üzümle %70 oranında *Aspergillus niger* ve *Aspergillus ochraceus* türlerini izole etmişlerdir. Birçok çalışmada ana OTA kaynağı *Aspergillus carbonarius* türü olarak belirlenmiştir. *Aspergillus nigri* ise çok geniş bir sıcaklık aralığında OTA üretme yeteneğine sahiptir (Esteban ve diğ., 2004).

Davis ve diğ. (1969), yaptıkları çalışmada *A. ochraceus*'un % 4 sukroz, % 2 maya ekstraktı içeren her 100 mL'lik besi ortamında 29 mg OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

Bayman ve diğ. (2002), OTA ürettiği bilinen türlerden *A. ochraceus* ve diğer bazı funguslar üzerinde yaptığı araştırmada OTA üretimi açısından *Aspergillus*'un bazı türlerini karşılaştırmıştır. *A. ochraceus* ve *A. melleus* türlerinin OTA üretiminde tespit edilebilir limiti geçmediğini, izole edilen *A. alliceus* türlerinin tamamının OTA ürettiğini hatta bazılarının yüksek değerlere ulaştığı belirtilmiştir. İncirle üzerinde

yapılan araştırmada OTA içeriğinin *A. alliceus* türünün varlığına bağlı olduğu ve *A. ochraceus* veya *Penicillium* trleri ile bir bağlantısı olmadığı ortaya konmuştur.

1.4. Okratoksin A'nın İnsan Sağlığı zerine Etkileri

OTA, nefrotoksik, teratojenik, sitotoksik, genotoksik, mutajenik, immunotoksik ve karsinojenik özellikte bir bileşiktir (Pohland ve diğ., 1992; Bayman ve diğ., 2002; Creppy, 2002; Assaf, 2004). IARC (International Agency for Research on Cancer) tarafından grup 2B'de olası kanserojen madde olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 1993). OTA'nın toksik etkileri, akut, subakut, kronik ve reprodaktif olabilmektedir. Hedef organı böbreklerdir fakat karaciğer, kalp morfolojisine ve kanın pıhtılaşma faktörlerine de etki etmektedir (Pohland ve diğ., 1992). Üriner sistemde tümör oluşumuna neden olan bir ajan olabileceği de düşünülmektedir (Peraica ve diğ., 1999). OTA 35 günlük kan yarıtmryle insan bedeninde oldukça kalıcı bir toksindir ve vücutta depolanmaz fakat heterojen vücut dağılımı böbreklere ciddi zarar getirebilir (Petzinger ve Ziegler, 2000). OTA böbrek tübüllerinde, organik anyon taşıyıcı proteinleri kullanarak salgılanır. Sonra OTA tüm anyon taşıyıcı proteinleri ya da diğer taşıyıcıları kullanarak nefron segmentlerinde geri emilir. Bu da eliminasyonu geciktirir ve böylece dokularda OTA birikimi riskini artırır (Pfohl-Leskowicz ve Manderville, 2007). OTA'nın antikor sentez seviyesi ve natural killer (NK) hücre aktivitesinin her ikisini de etkilediği rapor edilmiştir (Lea ve diğ., 1989). OTA düşük miktarlarında böbrekte, yüksek miktarlarında karaciğerde protein sentezini inhibe etmektedir. Çünkü OTA, fenilalanin-tRNA-sentetaz'ın katalizlediği bir reaksiyonu fenilalaninle yarışarak inhibe eder. Bu inhibisyon da yine fenilalanin ilavesi ile geri evrilebilmiştir. Günlük alım dozlarında OTA'nın renal glukoneogenez ve glukoneogenezde hız sınırlayıcı enzim olan sitozolik fosfoenolpiruvatkarboksikinazın (PEPCK) azalmasını sağladığı rapor edilmiştir (Pohland ve diğ., 1992). Ayrıca OTA'nın renal anyon veya katyonik transport sistemine de müdahale ettiği gözlemlenmiştir. Mitokondriyel transport proteinleri üzerinde, dikarboksilik asitler (malonat, süksinat), adenin nükleotitleri (ADP, ATP) ve inorganik fosfatlara bağlanarak, yarışmalı tip inhibitör olarak etki gösterdiği ve bu reaksiyonun süksinat konsantrasyonu artırılarak engellenebildiği gösterilmiştir (Meisner ve Chan, 1974). Bunun yanısıra alınan doza bağlı olarak RNA ve DNA sentezlerini inhibe ettiği

gösterilmiştir (Pohland ve diğ., 1992). Aynı zamanda OTA karaciğerde sitokin salınımını da etkilemektedir (Petzinger ve Weidenbach, 2002). Yapılan *in vivo* deneylerde, OTA ve fumanisin B1'in kombine olarak C6 gliyom, Caco-2 ve Vero hücreleri üzerinde toksisitesi incelenmiş ve bu kombinasyonun C6 gliyom hücrelerinde sitotoksitede bir artışa yol açtığı, Caco-2 hücrelerinde hücre canlılığını % 59-71 oranında azalttığı, Vero hücrelerinde ise hücre canlılığını % 72-86 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda az miktarda OTA'nın tek başına, Caco-2 hücrelerinde, canlı hücre sayısında % 47'lik bir azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (Creppy ve diğ., 2004).

OTA serum albüminine yüksek afinite ile bağlanır fakat protein denatüre ise bağlanmaz, bu durum, denaturasyon sonrası, OTA'nın albumin proteinindeki yüksek afinite gösterdiği bölgenin zarar gördüğünü göstermektedir (Il'ichev ve diğ., 2002). OTA; insan kanlarında, anne sütlerinde, çeşitli hayvanlarda ve gıdalarda tespit edilmiştir (Stoev, 2010; Abid ve diğ., 2003; Hassen ve diğ., 2004; Maarufi ve diğ., 1999; Schwerdt ve diğ., 2007; Palli ve diğ., 1999; Skaug ve diğ., 2001; Assaf ve diğ., 2004; Puntarić ve diğ., 2001; Esteban ve diğ., 2004). OTA geniş getiren hayvanlarda genellikle ön midede protozonlar ve bakteriyel enzimlerle hidrolizlenir, dolayısıyla dokularında çok az OTA bulunur. OTA'nın geniş getirmeyen memelilerde; farelerde 24-39 saat, sıçanlarda 55-120 saat, domuzlarda 72-120 saat, vervet maymunlarda 456-504 saat ve insanlarda 840 saat olmak üzere uzun yarı ömrü vardır (Creppy, 2002).

Tunus'ta 1983'ten bu yana hububat ve ev yapımı yemeklerde OTA tespit edilmektedir (Abid ve diğ., 2003). Bulgaristan, Romanya ve Yugoslavya olmak üzere üç balkan ülkesinde 1950'lerde bir böbrek hastalığı ortaya çıkmıştır (Pfohl-Leskowicz ve Manderville, 2007). 20.000 kişiyi etkileyen, kronik tubulointerstitial nefropati (CIN) hastalığı olan Balkan Endemik Nefropati (BEN)'ye sebep olan bir ajan olarak OTA gösterilmektedir ve OTA'nın gıdalardan bulaştığı fikri ağırlık kazanmıştır (Tatu ve diğ., 1998; Hassen ve diğ., 2004; Peraica ve diğ., 1999). Ayrıca hastalığın bu bölgedeki içme suyunda bulunan aromatik bileşenlerden kaynaklanabileceği de düşünülmektedir. Hastalığın coğrafi dağılımı ilk keşfedildiği 1950'lerden bu yana oldukça değişmiştir. BEN hastalarında görülen belirtiler; halsizlik, yorgunluk, baş ağrısı, soluk cilt, iştah azalması ve kilo kaybı gibi spesifik olmayan belirtiler olmasının yanında böbrek

hasarını gösteren, azalmış tübüler transport, aralıklı proteinüri ve kan nitrojeninde kademeli bir artış gibi spesifik işaretlerdir (Tatu ve diğ., 1998).

Stoev (2010), tavuklar üzerinde yaptığı çalışmada, OTA'nın, karaciğer ve böbrekte güçlü dejeneratif değişikliklere, lenfoid organlar hücrelerinde dejeneratif değişiklikler ve azalmaya, beyinde ödematoz ve dejeneratif değişikliklere, kas kanamalarına, kemik iliğinde yağ değişimine sebep olduğunu rapor etmiştir. OTA'nın karsinogenik etkisi için hedef organın, tavuklarda, böbrek ve karaciğer olduğu gösterilmiştir.

Hassen ve diğ. (2004), yaptıkları çalışmada OTA'nın karyomegalik nefropati ile ilişkisi üzerinde çalışmışlardır. Tunus'da yapılan bu çalışmada ayrıca OTA'nın Tunus'ta görülen bir nefropati (CIN) üzerinde etkileri de araştırılmış, CIN hastası 3 kişinin kan örneğinde yapılan araştırmada karyomegalik nefropati hücrelerinde yüksek miktarda OTA'ya rastlanmasına rağmen tam olarak OTA ile ilişkilendirilememiştir. Bu üç kişinin kanlarında ve bu üç kişiden ikisinin idrarında yüksek miktarda OTA'ya rastlamışlardır. Abid ve diğ. (2003), Tunustaki 954 nefropati hastasında ve 205 sağlıklı insanda yaptıkları araştırmada, hastalarda % 93-100 değerleri arasında, sağlıklı bireylerde ise % 62-82 değerleri arasında OTA'ya rastlamışlardır. Aynı şekilde CIN hastalarının kanlarında ve yemeklerinde de yüksek miktarda OTA'ya rastlamışlardır. Bu da aynı zamanda CIN hastalığının bilinmeyen etiyolojisini bilinir hale getirmiştir. Fungal çoğalma ve OTA kontaminasyonunun iklim şartları, coğrafi konum, sosyal ve ekonomik şartlar ve günlük beslenme ile ilişkisi de kurulmuştur (Abid ve diğ., 2003).

Maarufi ve diğ. (1999), yaptıkları çalışmada OTA'ya maruz kalan sıçanlar ile maruz kalmayan sıçanların hücre yapılarını karşılaştırmış ve OTA'ya maruz kalmayan sıçanlarda karyomegali gözlemlenirken, OTA'ya maruz kalan sıçanların tübül hücrelerinde OTA'nın karyomegali varlığını indüklediğini gözlemlemişlerdir. Bu durumla birlikte böbrekteki megasitoz ile karyomegaliyi OTA'nın tetikleyebileceğini öne sürmüşlerdir. Buna ek olarak intoksikasyonun erken dönemlerinde karyomegalik hücrelerde anormal mitoz gözlemişlerdir. Doksan gün sonra dejenerasyonun arttığını ve geri dönüşümsüz hale geldiğini göstermişlerdir.

Schwerdt ve diğ. (2007), yaptıkları çalışmada primer kültürlerde insan proksimal tübül hücrelerinde (RPTEC) ve insan fibroblastlarında OTA etkisini araştırmışlardır. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü, kollagen I, III, IV ve fibronektin sekresyonu ve

buna ek olarak NF- κ B aktivasyonunu incelemişlerdir. Hücre kültürleri 14 gün boyunca 10 μ mol/L OTA'ya maruz bırakılmıştır. Bu şartlar altında OTA'nın kapsaz-3 aktivitesi ve nekrozis üzerinde karşılaştırılabilir etkisi olduğunu göstermişlerdir. Beklenmedik bir şekilde çok düşük OTA konsantrasyonlarının (0,2-10 nM) maruz kalınan sürede hücre hipertrofisine sebep olduğunu tespit etmişlerdir. RPTEC, NF- κ B aktivitesinde ve kollajen III'te ve buna ek olarak OTA'nın böbrekteki profibrotik etkisi altındaki fibronektin sekresyonunda bir artış göstererek cevap oluşturduğunu kaydetmişlerdir. Bu cevaplara neden OTA'nın, BEN'de sıklıkla gözlemlenebilen, tübülointerstisyel fibrozisi yönlendirebildiğini açıklamaktadır. Özellikle bulunan sonuçlar OTA'nın sadece böbreği etkilemediği fibroblast gibi birçok hücrenin kaderini de değiştirebildiğini göstermiştir.

O'Brien ve diğ. (2001), yaptıkları çalışmada, LLC-PK1 (ECACC No.86121112), NRK-52E (DSMZ No. ACC 199) ve NRK-42F (DSMZ No. ACC 172) hücrelerini 48 saat boyunca OTA'ya maruz bırakmışlar, OTA ve OTB'nin toksik etkilerini gözlemleyerek, hayvanlarda ve insanlarda cinsiyete bağlı farklılıkları araştırmışlardır. Ortamdan hücre içine alınan OTA miktarlarının cinsiyete göre farklılık gösterebileceğini kaydetmişlerdir.

Lioi ve diğ. (2004), yaptıkları *in vitro* çalışmada, sığır lenfositlerinde OTA ve zearalenonun birlikte, sitogenetik ve sitotoksik etkilerini incelemiş ve kromozom hasarları ve kardeş kromatit değişimi gözlemlemişler ve buna ek olarak gelişmiş apoptozis aracılı olarak OTA'nın hücre canlılığında bir azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Palli ve diğ. (1999), yaptıkları çalışmada, İtalya'nın Toskana, Floransa bölgesinde yaşayan ve yaşları 35-65 arasında olan sağlıklı yetişkin bireylerin serum örneklerindeki OTA seviyelerini araştırmışlardır. Örneklerden 4 tanesi hariç % 97'sinde 0,12-2,48 ng/mL değerleri arasında ve ortalama olarak 0,56-0,48 ng/mL değerlerinde OTA tespit edilmiştir. OTA seviyelerini belirgin şekilde erkeklerde kadınlara oranla daha fazla gözlemlemişler ve bu durumu pozitif olarak bireylerin boylarıyla ilişkilendirmişlerdir. Bunun yanısıra mevsim farklılığı ile ilişkisini ortaya koymuşlar ve yaz mevsiminde alınan kan örneklerinde, sonbaharda alınan örneklere nazaran daha yüksek miktarda OTA tespit etmişlerdir. Aynı zamanda; sistolik ya da diyastolik kan

basıncı, yaş, kilo, kütle vücut indeksi ve sigara içme geçmişleri ile ilişkisini kuramamışlardır.

Skaug ve diğ. (2001), 80 Norveç kadının sütlerindeki OTA miktarlarını HPLC yöntemi ile belirlemiş ve günlük diyetleri ile ilişkilendirmiştir. Günlük diyetinde ciğer ürünleri (ciğer salamı gibi) ve pasta (kurabiye, meyve kekleri, çikolata kekleri gibi) tüketen bireylerin sütlerinde daha yüksek miktarda OTA tespit etmişlerdir. Aynı zamanda OTA kontaminasyon riski meyve suyu (tüm çeşitleri) alımı ile de artmaktadır. Buna ek olarak; kahvaltılık gevrek, işlenmiş et ürünleri ve peynir de diyetle OTA alımına önemli katkılar sağlamaktadırlar. Sütteki OTA kontaminasyonu ile sigara içimi, yaş, antropometrik veri ve vücut ağırlığı arasında bir bağ kuramamışlardır.

Assaf ve diğ. (2004), yaptıkları çalışmada, Lübnan'da yaşayan bireylerin kanlarında ve günlük tükettikleri gıdalarda OTA seviyelerini belirlemeyi amaçlamış ve sağlıklı bireylerden aldıkları plazma örneklerinde ve aynı zamanda hububat ve bira örneklerinde OTA tespit etmişlerdir. 250 plazma örneğinin % 33'ünde 0,1-0,87 ng/mL değerleri arasında ve ortalama olarak $0,17 \pm 0,01$ ng/mL; buğday, bulgur ve bira'da ise sırasıyla ortalama $0,15 \pm 0,03$ µg/kg, $0,21 \pm 0,04$ µg/kg ve $0,19 \pm 0,12$ ng/mL OTA tespit etmişlerdir. Plazma örneklerindeki sonuçları karşılaştırdıklarında Palli ve diğ. (1999) ve O'Brien ve diğ. (2001)'in aksine cinsiyet farklılığına bağlı bir durum tespit etmemişlerdir. Aynı zamanda yaşlara göre bir fark da gözlemlememişlerdir. Sadece Güney Lübnan'dan alınan plazma örneklerinde diğer bölgelere nazaran daha fazla OTA tespit etmişlerdir. Fakat buldukları değerler günlük tolare edilebilir limitleri aşmamıştır.

Radić ve diğ. (1997), yaptıkları çalışmada Hırvatistan'ın hiperendemik bölgesi Kaniža ve endemik olmayan bölgelerinde 10 yıllık bir takip yapmışlar ve endemik nefropati gözlemlememişlerdir. Bu bölgelerdeki insanların kanlarında % 4,5 (2-50 ng/mL değerleri)- % 2,4 (2-10 ng/mL değerleri) arasında OTA tespit etmişlerdir. Aynı zamanda bu bölgelerdeki gıda ve yemlerin de OTA ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada OTA'nın proksimal tübül hücrelerinin apikal bölgelerine taşınmasında, insan organik anyon taşıyıcı proteini (hOAT4)'nin yüksek afinite ile aracılık ettiğini ve bu taşımının probenesid, piroksikam, oktanat ve sitrinin ile inhibe edilebildiğini göstermiştir. Etki dereceleri büyükten küçüğe probenesid> piroksikam> oktanat> sitrinin olarak belirlenmiştir (Babu ve diğ., 2002).

Stoev (2010), tavuklarda yaptığı çalışmada, 5 ppm OTA konsantrasyonuna 25 ppm L-β-Fenilalanin (Phe) uygulamış ve bu konsantrasyonlarda Phe'nin, OTA'nın karsinogenik ve toksik etkilerine karşı gerçek bir koruyucu olarak kullanılamayacağını göstermiştir.

1.5. Şarap ve Okratoksin A

Şaraplarda OTA ilk olarak, 1996 yılında yaptıkları çalışma ile, Zimmerli ve Dick tarafından tespit edilmiştir (Mateo ve diğ., 2007). Üzüm ve üzümde yapılmış ürünlerde OTA kaynağı, *A. carbonarius* ve *A. niger* türleridir. OTA kontaminasyonu üzüm çeşidine göre farklılık göstermektedir (Leong ve diğ., 2006a).

Fransa'da yapılan bir çalışmada, üzümde ve şıradaki OTA üreten türler ve OTA araştırılmış ve 11 çeşit üzümde 59 filamentöz fungi ve iki maya türü izole edilmiştir. Bu 11 örnekte 6 tanesinin potansiyel *Aspergillus carbonarius* gibi okratoksinik türlerle kontamine olduğu tespit edilmiştir. *in vitro* deneylerde *Aspergillus carbonarius*'un OTA ürettiği tespit edilmiştir. Bu 11 üzüm çeşidinin 8'inden yapılmış şıradaki ise OTA tespit edilmiştir. Böylece şarapta OTA kontaminasyonu ile şarabın yapıldığı üzümün OTA üreten türlerle kontaminasyonunun ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sage ve diğ., 2002).

Avustralya şaraplık bağlarında yapılan bir çalışmada *A. carbonarius* türü toprakta ve toprak üzerindeki şarap posasında yüksek miktarlarda, diğer substratlarda ise düşük miktarlarda bulunmuştur. Toprak yüzeyinde diplere nazaran daha yüksek miktarda *A. carbonarius* izole edilmiştir (Leong ve diğ., 2006a). Şarap yapımı sırasında OTA oluşumu olmadığı çünkü fungal gelişmenin alkol ile durduğu, kırmızı şaraplarda beyaz şaraplara nazaran daha fazla OTA bulunduğu, bu durumun kırmızı şarap üretiminin maserasyon basamağında OTA içeriğinde bir artıştan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Luchetta ve diğ., 2010). Benzer şekilde Soleas ve diğ. (2001), Kanada'da yaptıkları çalışmada değişik ülkelerden topladıkları 942 şarap örneğinde OTA tespit etmiş ve kırmızı şarapların beyaz şaraplardan daha yüksek miktarda OTA içerdiğini ve güney Avrupa ülkelerinden alınan şarap örneklerinde, kuzey Avrupa ülkelerinden alınan örneklere kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda OTA içeriği saptandığını bildirmiştir. Buna karşın, Luchetta ve diğ. (2010), İtalya'daki üzümde yaptıkları çalışmada

örneklerin % 30,4'ünde OTA tespit etmiş; kırmızı ve beyaz üzümlerdeki OTA miktarlarında istatistiksel olarak bir fark bulamamışlar; yüksek OTA konsantrasyonunun güney İtalya'dan, düşük OTA konsantrasyonunun merkez ve kuzey İtalya'dan alınan örneklerde olduğunu göstermiş; güney bölgede Avrupa Komisyonu (EC)'nin belirlediği üst limiti aşan değerler bulunurken, merkez ve kuzey İtalya'da bu limiti aşan değerler bulamamışlardır.

Bacaloni ve diğ. (2005), on-line katı-faz ekstraksiyon-sıvı kromatografi-elektrospray ve hemen arkasından kütle spektrometresi (SPE-LC-ESI-MS/MS) ile oluşturulan sistemde İtalya'daki şaraplarda OTA seviyelerini incelemişler, 0,03-1,44 ng/mL değerlerinde OTA'ya rastlamışlardır.

Reinsch ve diğ. (2005), yaptıkları çalışmada baharatla kaynatılmış şaraplarda ortalama 1,34-1,40 µg/kg OTA tespit etmişlerdir.

Altıokka ve diğ. (2009), yaptıkları çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinden topladıkları 25 şarap örneğinde ortalama 2,36 µg/L olmak üzere, Batı bölgesinden alınan örneklerde 5,36 µg/L, Doğu Anadolu bölgesinden alınan örneklerde 3,33 µg/L, Marmara bölgesinden alınan örneklerde 5,29 µg/L, Trakya bölgesinden alınan örneklerde 2,24 µg/L, Ege'den alınan örneklerde 0,97 µg/L, İç Anadolu'dan alınan örneklerde 2,17 µg/L ortalama OTA miktarları tespit etmişlerdir. Bulunan değerlerin bir çoğu EC'nin belirlediği yasal limitin üzerindedir.

Anlı ve diğ. (2005), yaptıkları çalışmada, 2001 ve 2002 yılları arasında Türkiye'nin değişik bölgelerinde hasat edilen 47 şarap örneğinde OTA analizi yapmışlar ve bu örneklerde ortalama 0,02-2,23 µg/kg değerleri arasında OTA saptamışlar, kırmızı şarapların beyaz ve pembe şaraplardan daha fazla, bölgelere göre ise; Trakya ve Ege bölgelerinde diğer bölgelere nazaran daha fazla OTA tespit etmişlerdir.

Var ve Kabak (2007), Türkiye'nin farklı bölgelerinden topladıkları 95 şarap örneğinde yaptıkları analizlerde; Trakya bölgesinden aldıkları 44 şarap örneğinde ortalama 0,158 ng/mL, Ege bölgesinden aldıkları 28 şarap örneğinde ortalama 0,060 ng/mL, İç Anadolu bölgesinden aldıkları 15 şarap örneğinde ortalama 0,027 ng/mL, Doğu Anadolu bölgesinden aldıkları 8 şarap örneğinde ortalama 0,027 ng/mL değerlerinde OTA tespit etmişlerdir. Bu örneklerden sadece 47 tanesi Türkiye'de

üretilmiş olup diğerleri Avrupa ülkelerinden ve Amerika'dan Türkiye'ye ithal edilmiş şaraplardır.

Rosa ve diğ. (2004), Brezilya, Arjantin, Şili ve Güney Amerika bölgelerinden topladıkları 25 şarap örneğinde ülkelere göre sırasıyla; 28,3-42,4 ng/L; 28,3-42,4 ng/L; 28,3-70,7 ng/L; 28,3-70,7 ng/L değerlerinde OTA tespit etmişlerdir. Brezilya ve Güney Amerika'da en yüksek OTA değerleri pembe şaraplarda gözlenirken, Arjantin'de en yüksek değer kırmızı şaraplarda elde edilmiştir.

Chiodini ve diğ. (2006), Hollanda'da ev şarapları ve fabrikasyon şaraplarda yaptıkları çalışmada, 0,05 µg/L değerinin üzerindeki değerleri tespit edebilecek hassasiyette bir yöntem kullanmışlar ve kırmızı şaraplarda <0,05 µg/L-0,75 µg/L, pembe şaraplarda <0,05 µg/L-0,092 µg/L, beyaz şaraplarda <0,05 µg/L-0,22 µg/L değerlerinde OTA tespit etmişlerdir. Araştırmada fabrikasyon ve ev şaraplarının OTA içeriği arasında istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir.

Domijan ve Peraica (2004), Hırvatistan'da yaptıkları çalışmada, güney bölgelerde daha fazla olmak üzere kuzey bölgeden alınan 3 beyaz şarap hariç tüm kırmızı ve beyaz şaraplarda OTA bulmuşlardır. Kırmızı şaraplarda en yüksek 47 ng/L, beyaz şaraplarda 22 ng/L ve ortalama olarak kırmızı şaraplarda 22±11 ng/L, beyaz şaraplarda 10±9 ng/L, güney bölgelerden gelen örneklerde 25±12 ng/L ve kuzey bölgelerden gelen örneklerde 11±8 ng/L OTA tespit etmişlerdir.

Shephard ve diğ. (2003), Güney Afrika şaraplarında yaptıkları çalışmada, 24 örnekte 0,04-0,39 µg/L değerleri arasında, kırmızı şaraplarda ortalama 0,24 µg/L, beyaz şaraplarda ortalama 0,16 µg/L OTA tespit etmişler ve sadece iki örnekte Avrupa limitlerini aşan değerler elde etmişlerdir.

Stander ve Steyn (2002), Afrika şaraplarında bulunan OTA miktarları ile ilgili yaptıkları çalışmada, ucuz ve pahalı şarapları karşılaştırmışlar ve pahalı şaraplarda daha düşük OTA tespit etmişlerdir. Bu durumun üzümlerin daha kaliteli olması ya da şarap yapım sürecinin daha kaliteli olmasına bağlanabilmektedir. Geç hasat edilen üzümlerden yapılan bazı şaraplar dışında, şarap örneklerinde Avrupa limitlerini aşan bir değere rastlamamışlardır.

1.6. Şarapta Okratoksin A Limitleri ve Şarapta Okratoksin A Varlığının Engellenmesi

Avrupa komisyonu şarapta OTA bulunma üst limitini 2 µg/kg olarak belirlemiştir (EC, 2005). JECFA 37. toplantısında OTA'yı değerlendirmiş ve bu toksin için haftalık tolare edilebilir alım miktarını 112 ng/kg vücut ağırlığı olarak sınırlamıştır (Günlük alımı 16 ng/kg vücut ağırlığına karşılık gelmektedir) (JECFA, 1998).

Yapılan çalışmalar aktif karbon, silika jel, potasyum kaseinat, yumurta albumini ve jelatinin OTA'yı şaraptan uzaklaştırabildiğini göstermiştir. Potasyum kaseinat ve aktiflenmiş karbonun OTA'nın uzaklaştırılmasında en etkili ajanlar olduğu bulunmuştur (Castellari ve diğ., 2001). Castellari ve diğ. (2001), yaptıkları araştırmada potasyum kaseinatın OTA'nın % 82 kadarını uzaklaştırabildiğini ve aktiflenmiş karbonun total polifenollerde, en yüksek spesifik absorpsiyon kapasitesini göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada mikroorganizmaların mikotoksinler üzerinde degrade edici etkisi olup olmadığı araştırılmış ve *A. fumigatus*, siyah Aspergilli ve *A. niger* türlerinin OTA üzerinde degrade edici etkisi olduğu tespit edilmiştir ve degradasyon ürünü olarak okratoksin α elde edilmiştir (Varga ve diğ., 2000).

Murthy ve diğ. (2009), yaptıkları çalışmada ajowan bitkisinin ilaç etkisini, fungal gelişme üzerinde denemişler ve *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium moniliforme* ve *Penicillium* türlerinin gelişimine karşı aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. *Aspergillus ochraceus* ve *Aspergillus flavus* türlerini sırasıyla % 69 ve % 38 oranında inhibe ettiğini kaydetmişlerdir. Aynı zamanda gıda örneklerinden alınan sonuçlarda önemli oranda *A. ochraceus* türünün inhibe edildiği ve 7 gün sonunda bile % 20 gibi yüksek bir nem değerinde dahi hiçbir OTA konsantrasyonu belirlenmediğini kaydetmişlerdir.

Üzümlerde tespit edilen predominant mikobiyota olan *black Aspergillus* kontaminasyonunun önlenmesi, üzümlerde ve dolayısıyla şaraplarda OTA içeriğinin minimize edilmesi için önemli olacaktır (Esteban ve diğ., 2004).

Avusturya şaraplık bağlarında yapılan bir çalışmada; şarap yapımı sırasında presleme, klarifikasyon ve fiçıda bekletme basamakları sırasında OTA miktarının azaldığı bildirilmektedir. Presleme basamağında kırmızı ve beyaz şaraplarda bulunan OTA miktarında % 70'lik bir azalma tespit edilmiştir. Fakat yine de kırmızı şaraplarda

beyaz şaraplara oranla 3 kat daha fazla OTA bulunmuştur. Bunun sebebi olarak beyaz şaraplarda presleme basamağından önce alkol bulunmaması gösterilebilir, böylece OTA protein ve diğer katılara bağlanabilir. Kırmızı şarapta ise presleme alkol oluşumundan sonra yapıldığı için, alkol varlığında OTA proteinlere daha az bağlanır ve sıvı fazda daha fazla çözünür (Leong ve diğ., 2006a).

Leong ve diğ. (2006b), yaptıkları çalışmada, bentonit ve potasyum kaseinat ilavesinin ve şarabın 10-14 ay depolanmasının OTA miktarında bir düşüşe sebep olduğunu ve jelatin ilavesinin de OTA miktarının azaltılmasında bir miktar etkili olduğunu fakat balık tutkalı veya polivinilpirolidon ilavesinin OTA miktarına etki etmediğini tespit etmişlerdir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılmak üzere Antalya, Isparta ve Burdur olmak üzere 3 ildeki marketlerden, 36 farklı şarap örneği, Mayıs-Temmuz 2011 tarihleri arasında toplanmıştır. Örnek toplama sırasında renk ve üzüm çeşitliliği göz önüne alınmıştır (Çizelge.1). Analizler 2011 yılı temmuz ayı içerisinde yapılmıştır.

Çizelge.1 Batı Akdeniz Bölgesi'nden alınan 36 adet farklı şarap örneği.

Örnek sırası	Üretildiği yer	Alındığı il	Üretim tarihi	Satışa sunulduğu tarih	Üzüm çeşidi	Şarap çeşidi
1	Isparta	Isparta	2009	2010	Ulubey Karası	Pembe
2	İthal	Antalya	2009	2010	Cabernet Sauvignon	Kırmızı
3	İthal	Antalya	2007	2008	Savignon	Beyaz
4	İthal	Antalya	2008	2009	Shiraz	Kırmızı
5	İstanbul	Antalya	2010	2011	Kavak	Kırmızı
6	İthal	Antalya	2009	2010	Merlot	Kırmızı
7	İstanbul	Antalya	2006	2007	Öküzgözü-Boğazkere	Kırmızı
8	İthal	Antalya	2009	2010	Savignon Blanc	Beyaz
9	İstanbul	Antalya	2010	2011	Emir- Narince	Beyaz
10	İstanbul	Isparta	2009	2010	Öküzgözü	Kırmızı
11	İstanbul	Antalya	2009	2010	Misket	Yarı Tatlı Beyaz
12	İstanbul	Antalya	2010	2011	Kalecik Karası	Pembe
13	Burdur	Burdur	2010		Ev şarabı	Kırmızı
14	Burdur	Burdur	2010		Ev şarabı	Kırmızı
15	Burdur	Burdur	2010		Ev şarabı	Kırmızı
16	İthal	Antalya	2006	2007		Kırmızı
17	Antalya	Antalya	2008	2009	Savignon Blanc	Beyaz
18	Isparta	Isparta	2009	2010	Öküzgözü	Kırmızı
19	Antalya	Antalya	2009	2010	Chardonnay	Beyaz
20	Isparta	Isparta	2009	2010	Öküzgözü-Çalkarası	Kırmızı
21	Antalya	Antalya	2009	2010	Cabernet Sauvignon	Kırmızı
22	Antalya	Antalya	2009	2010	Kalecik Karası	Kırmızı

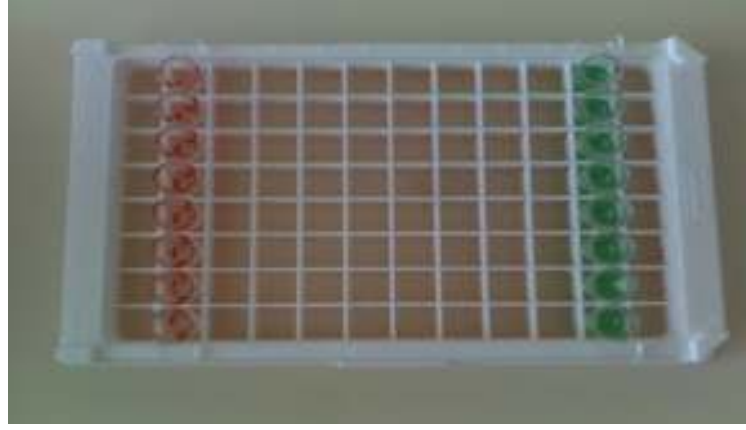
Çizelge.1 Batı Akdeniz Bölgesi'nden alınan 36 adet farklı şarap örneği (devam).

Örnek sırası	Üretildiği yer	Alındığı il	Üretim tarihi	Satışa sunulduğu tarih	Üzüm çeşidi	Şarap çeşidi
23	Antalya	Antalya	2009	2010	Cabernet Savignon-Boğazkere	Kırmızı
24	Antalya	Antalya	2009	2010	Savignon Blanc	Beyaz
25	Antalya	Antalya	2008	2009	Savignon Blanc	Beyaz
26	Antalya	Antalya	2010	2011	Kalecik Karası-Cabernet Savignon-Merlot	Kırmızı (Yarı Tatlı)
27	Antalya	Antalya	2010	2011	Chardonnay-Savignon Blanc	Beyaz
28	Antalya	Antalya	2009	2010	Kalecik Karası	Pembe
29	Antalya	Antalya	2008	2009	Chardonnay	Beyaz
30	Antalya	Antalya	2010	2011	Cabernet Savignon-Öküzgözü	Kırmızı
31	Antalya	Antalya	2009	2010	Merlot- syrah-Öküzgözü	Kırmızı
32	Isparta	Isparta	2009	2010	Dimrit-Çalkarası	Kırmızı
33	İzmir	Burdur	2007	2010	Asmalıbağ	Beyaz
34	Burdur	Burdur	2010	2011	Ev şarabı	Kırmızı
35	Denizli	Isparta	2010	2011	Senfoni Sultaniye	Beyaz
36	İzmir	Isparta	2007	2010	Asmalıbağ	Kırmızı

2.2. Yöntem

Batı Akdeniz bölgesinde tüketilen toplam 36 adet farklı şarap örneği, okratoksin A miktarları açısından ELISA yöntemi (HELICA Ochratoxin A in Alcoholic Beverages kiti) ile analiz edildi. Örnekler ve kit analiz gününe kadar buzdolabında (+4 °C ±1) saklandı. Öncelikle kit ile birlikte verilen standart serisinin analizi yapıldı. Test sonuçlarının tayini için standart eğri çizildi. Şarap örneklerinden, şişeler hafifce çalkalandıktan sonra pipetör şişenin ortasına kadar daldırılarak 1'er mL örnek alındı ve % 70'lik metanolde 1 (örnek): 20 (metanol) oranında seyreltildi, her bir örnek biri kontrol olmak üzere iki kuyucukta analiz edildi. Test prosedürü, üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde, aşağıdaki gibi uygulandı.

1. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Toz halindeki PBS (Kit ile birlikte verilen fosfat tamponu) 1 litre distile su ile sulandırıldı. Kullanılmadığı sürelerde buzdolabında saklandı.
2. Testi yapılacak her bir standart ya da örnek için bir karıştırma veli mikrovell kulplarına yerleştirildi. Diğer mikro kulpa eş miktarda antikor kaplı veller yerleştirildi.
3. SA diluent'den (kit ile birlikte verilen seyreltme çözeltisi) 200 µL her karıştırma veline dağıtıldı.
4. Her biri için farklı pipet kullanarak, uygun seyreltme içeren karıştırma velinin içine 100 µL her standart ve örnek preparatından eklendi. Çalışma pipetörüyle 3 kez karıştırıldı.
5. Her biri için yeni bir pipet ucu kullanarak, her karıştırma veli içeriklerinden 100 µL, antikor kaplı ELISA vellerine aktarıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
6. Mikrovellerdeki içerikler dikkatlice havlu kağıtların üzerine aniden ters çevrilerek boşaltıldı. Mikrovellerin her biri yıkama solusyonu doldurarak yıkandı sonra aynı şekilde boşaltıldı. Yıkama 3 kez tekrar edildi.
7. Mikroveller ters çevrilerek hafifçe emici havlu üzerine mevcut su aktarıldı.
8. Konjugattan 100 µL her antibody kaplı velle eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Şekil 3'de gösterilen renk değişimi gözlemlendi.
9. 6. ve 7. basamaklar tekrar edildi.
10. Substrat reaktifinden gerekli hacim ölçüldü (120 µL/vel) ve ayrı bir kaba koyuldu. Her bir mikrovelle 100 µL eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Renk değişimi gözlemlendi.
11. Stop solüsyonundan (Kit ile birlikte verilen, reaksiyonu durdurucu çözelti) gerekli hacim ölçüldü (120 µl/vel) ve ayırma kabına koyuldu. Substrata göre aynı sıra ve aynı hızda 100 µL eklendi. Şekil 4.'de gösterilen renk değişimi gözlemlendi (şekil 4.).

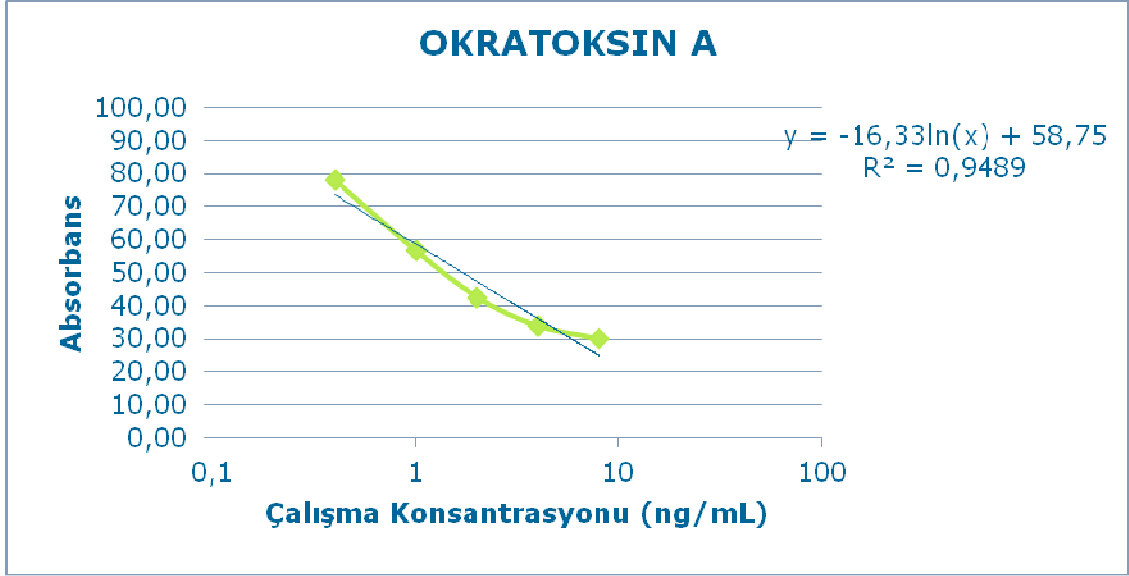


Şekil 3. Sekizinci basamağın uygulanması sonrası renk değişimi.



Şekil 4. Onbirinci basamak sonrası renk değişimi.

12. ELISA okuyucusu ile 450nm'de absorbans değerleri kaydedildi. Standart çözeltilerden elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri çizildi (Şekil 5). Bilinmeyen örnekler standart eğrisinden aradeğer bulunarak ölçüldü.



Şekil 5. Standart eğri.

İstatistiksel analizler için Minitab 15 istatistik programı kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıkları tespit etmek için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Ortalama ve standart sapmalar da, Minitab 15 programı içerisindeki “Store descriptive statistics” bölümünden hesaplatıldı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 2’de, analiz edilen örneklerdeki okratoksin A miktarları, örnek numaraları ile birlikte belirtilmiştir.

Çizelge.2 Örneklerin etiket bilgileri ve okratoksin A miktarları

Örnek sırası	Üretildiği yer	Üretim tarihi	Satışa sunulduğu tarih	Üzüm çeşidi	Şarap çeşidi	Okratoksin A miktarı (ng/mL)
1	Isparta	2009	2010	Ulubey Karası	Pembe	0,12
2	İthal	2009	2010	Cabernet Sauvignon	Kırmızı	0,13
3	İthal	2007	2008	Savignon	Beyaz	0,19
4	İthal	2008	2009	Shiraz	Kırmızı	0,11
5	İstanbul	2010	2011	Kavak	Kırmızı	0,13
6	İthal	2009	2010	Merlot	Kırmızı	0,09
7	İstanbul	2006	2007	Öküzgözü-Boğazkere	Kırmızı	0,21
8	İthal	2009	2010	Savignon Blanc	Beyaz	0,23
9	İstanbul	2010	2011	Emir-Narince	Beyaz	0,15
10	İstanbul	2009	2010	Öküzgözü	Kırmızı	0,13
11	İstanbul	2009	2010	Misket	Yarı Tatlı Beyaz	0,22
12	İstanbul	2010	2011	Kalecik Karası	Pembe	0,20
13	Burdur	2010		Ev şarabı	Kırmızı	0,10
14	Burdur	2010		Ev şarabı	Kırmızı	0,10
15	Burdur	2010		Ev şarabı	Kırmızı	0,22
16	İthal	2006	2007		Kırmızı	0,24
17	Antalya	2008	2009	Savignon Blanc	Beyaz	0,17
18	Isparta	2009	2010	Öküzgözü	Kırmızı	0,28
19	Antalya	2009	2010	Chardonnay	Beyaz	0,13
20	Isparta	2009	2010	Öküzgözü-Çalkarası	Kırmızı	0,10

Çizelge.2 Örneklerin etiket bilgileri ve okratoksin A miktarları (devam)

21	Antalya	2009	2010	Cabernet Savignon	Kırmızı	0,15
22	Antalya	2009	2010	Kalecik Karası	Kırmızı	0,20
23	Antalya	2009	2010	Cabernet Savignon-Boğazkere	Kırmızı	0,01
24	Antalya	2009	2010	Savignon Blanc	Beyaz	TLA*
25	Antalya	2008	2009	Savignon Blanc	Beyaz	TLA*
26	Antalya	2010	2011	Kalecik Karası-Cabernet Savignon-Merlot	Kırmızı Yarı Tatlı	TLA*
27	Antalya	2010	2011	Chardonnay-Savignon Blanc	Beyaz	0,14
28	Antalya	2009	2010	Kalecik Karası	Pembe	0,11
29	Antalya	2008	2009	Chardonnay	Beyaz	0,15
30	Antalya	2010	2011	Cabernet Savignon-Öküzgözü	Kırmızı	0,22
31	Antalya	2009	2010	Merlot-Syrah-Öküzgözü	Kırmızı	0,13
32	Isparta	2009	2010	Dimrit-Çalkarası	Kırmızı	0,12
33	İzmir	2007	2010	Asmalıbağ	Beyaz	0,23
34	Burdur	2010	2011	Ev şarabı	Kırmızı	0,11
35	Denizli	2010	2011	Senfoni Sultaniye	Beyaz	0,24
36	İzmir	2007	2010	Asmalıbağ	Kırmızı	0,15

*TLA: Tespit edilebilir limitin altında

Çizelge.3 Renklerine göre şarap çeşitlerinin ortalama okratoksin A miktarlarının karşılaştırılması

Şarap çeşidi	Örnek sayısı	Ortalama okratoksin miktarları (ng/mL)	Standart sapma
BEYAZ	12	0,15	0,03
PEMBE	3	0,14	0,03
KIRMIZI	21	0,14	0,02

Pembe şarap örnek sayısı istatistiksel değerlendirme yapılabilecek kadar fazla olmadığı için sadece kırmızı ve beyaz şaraplar arasında istatistiksel analiz yapıldı ve bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$) (Çizelge 3.).

Çizelge.4 Üretim şekillerine göre şarapların okratoksin A miktarlarının karşılaştırılması

Üretim şekli	Örnek Sayısı	Ortalama okratoksin A miktarları (ng/mL)	Standart sapma
EV ŞARABI	4	0,13	0,03
FABRİKASYON ŞARAPLAR	32	0,14	0,02

Ev şarapları örnek sayısı istatistiksel değerlendirme yapılacak kadar fazla olmadığı için, ev şarapları ve fabrikasyon şaraplar arasında istatistiksel fark analizi yapılmamış fakat ortalama değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.).

Çizelge.5 Üzüm çeşidine göre örneklerin okratoksin A miktarlarının kıyaslanması

Üzüm çeşidi	Örnek sayısı	Okratoksin A miktarları (ng/mL)*
Ulubey karası	1	0,12
Cabernet Savignon	1	0,13
Savignon Blanc	5	0,12
Shiraz	1	0,11
Kavak	1	0,13
Merlot	1	0,09
Öküzgözü	2	0,21
Misket	1	0,22
Kalecik Karası	3	0,17
Ev Şarabı	4	0,13
Chardonnay	2	0,14
Cabernet Savignon	2	0,14
Kalecik Karası	2	0,16
Asmalıbağ	1	0,19
Sultaniye	1	0,24

*Örnek sayısı birden fazla olan örnekler için ortalama değerler hesaplanmıştır.

Çalışmada 36 adet farklı şarap örneği kullanılmıştır. Bu örneklerde esas olarak üzüm çeşitliliği göz önüne alınmıştır. Değişik üzüm çeşitlerine göre OTA miktarları ortalamaları tespit edilmiş, fakat örnek sayıları yetersiz olduğu için bunlar arasında bir istatistiksel fark analizi yapılmamıştır (Çizelge 5.).

Çizelge.6 İki veya daha fazla üzüm çeşidinin karıştırılmasıyla elde edilen örneklerin okratoksin A miktarlarının kıyaslanması

Üzüm Çeşidi	Örnek Sayısı	Okratoksin A Miktarları (ng/mL)
Öküzgözü-Boğazkere	1	0,21
Öküzgözü-Çalkarası	1	0,10
Cabernet Sauvignon- Boğazkere	1	0,01
Kalecik karası- Cabernet Sauvignon-Merlot	1	TLA
Chardonnay-Sauvignon Blanc	1	0,14
Cabernet Sauvignon- Öküzgözü	1	0,22
Merlot- Syrah- Öküzgözü	1	0,13
Dimrit-Çalkarası	1	0,12

Şarap örneklerinden bazıları iki veya daha fazla çeşit üzümün karıştırılmasıyla ya da 2 veya daha fazla üzümünden elde edilmiş şarapların karıştırılmasıyla elde edilen şaraplardır. Bu örneklerde OTA miktarları belirlenmiş fakat örnek sayıları yetersiz olduğu için bunlar arasında bir istatistiksel fark analizi yapılmamıştır (Çizelge 6.)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mikotoksinler ile üzümlerin ve dolayısıyla şarabın kontamine olması hasat zamanından başlayan bir problemdir. Hasat öncesi, hasat sırasında, hasat sonrasında ve hatta üzüm üretimi yapılan toprakta kontaminasyonlar tespit edilmiştir (Leong ve diğ., 2006a; Cabañes ve diğ., 2002; Esteban ve diğ., 2004).

Yapılan bazı çalışmalarda öküzgözü üzümünden elde edilen şaraplarda diğerlerine nazaran daha yüksek miktarda OTA tespit edilmiştir (Altıokka ve diğ., 2009). Bunun sebebi olarak öküzgözü üzümünün yapısı gösterilebilir. Öküzgözü üzümü ince kabukludur ve meyve yaralanması daha kolay olabilir. Yaralanma sonrasında mikroorganizmalar rahatlıkla meyvenin içine girebilirler ve toksinlerini burada üretebilirler. Fakat eğer üzüm kabuğu kalınsa üzüm kolay yaralanmayabilir, mikroorganizmalar üzüm suyuna bulaşamayabilir ve üzüm pH'sı düşük ise bu durum mikroorganizma gelişimine uygun olmayabilir, dolayısıyla bu üzümlerde kontaminasyon daha az gözlenebilir. Bu tez çalışmasında da öküzgözü üzümünden yapılmış 7 ve 30 numaralı örneklerde diğerlerine kıyasla daha yüksek miktarda OTA tespit edilmiştir.

Yine bu çalışmada ev şarabı örneklerinin sayısı yetersiz olduğu için istatistiksel analiz yapılmadı fakat birebir değerlerin karşılaştırması yapılırsa ev şaraplarının fabrikasyon şaraplardan farklı değerlerde OTA içermediği gözlemlenmektedir. Benzer şekilde Chiodini ve diğ. (2006), yaptıkları çalışmada fabrikasyon ve ev şaraplarını karşılaştırmışlar ve istatistiksel bir fark bulamamışlardır.

Bazı çalışmalarda kırmızı şarapların diğerlerinden daha yüksek miktarda OTA içerdiği tespit edilmiştir (Domijan ve Peraica, 2004; Soleas ve diğ., 2001; Anlı ve diğ., 2005). Bunun yanında Luchetta ve diğ. (2010), İtalya üzümlerinde yaptıkları çalışmada beyaz ve kırmızı üzüm arasında OTA içeriği bakımından istatistiksel bir fark tespit etmemişlerdir. Bu durum OTA kontaminasyonunun üretim proseslerinden kaynaklandığını gösteriyor olabilir. Kırmızı üzüm üretiminde kabuklar da şıranın içinde yer alırken, beyaz şarapta kabuklar preslenerek üretime başlamadan uzaklaştırılır ve düşük sıcaklıklarda çalışılır. Bu durum da kontaminasyonun üzüm kabuğunda ya da kullanılan ekipmanlarda yoğunlaşabileceğini düşündürülebilir. Yine benzer şekilde kırmızı şarap üretimi aşamalarından maserasyon basamağında OTA içeriğinde bir artış

olabileceği de düşünülmektedir (Luchetta ve diğ., 2010). Yaptığımız çalışmada da kırmızı ve beyaz şarap örneklerinde bulunan OTA miktarları arasında istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir.

Şarap ya da meyve suyu fabrikalarında üretim başlamadan önce yapılan sterilizasyon benzeri proseslerle (uygun filtrelerle fiziksel olarak uzaklaştırma veya degradasyon) OTA miktarının azaltıldığı tahmin edilmektedir. Fiziksel olarak uzaklaştırma, gözle görülür küflü meyvelerin üretime alınmaması ya da proses sırasında katı ve sıvı faz arasında parçalanmasıdır. Degradasyonun şarap üretimi sırasında malolaktik fermentasyon basamağında laktik asit bakterileri tarafından azaltıldığı düşünülmektedir. Ayrıca sülfür dioksit ilavesi ve meyve suyu yapımındaki pastörizasyon işlemlerinin OTA'ya etki etmediği belirtilmiştir (Leong ve diğ., 2006a).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında kullanılan 36 şarap örneğinden hiçbiri Türk Gıda Kodeksi'nce, Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ'de belirtilen, şarapta bulunabilen maksimum OTA limitini aşmamıştır (Türk Gıda Kodeksi, 2009). 2005, 2007 ve 2009 yıllarında yapılan Türk şaraplarında OTA tespiti ile ilgili çalışmalarda bu limiti aşan örnekler tespit edilmiştir (Altıokka ve diğ., 2009; Anlı ve diğ., 2005; Var ve Kabak, 2007). Bu çalışmada örneklerin yasal limitin altında OTA içermesi üreticilerin bilinçlendiği ve OTA kontaminasyonuna daha çok dikkat edildiğini gösterebilir. Bu sonuç, aynı zamanda üzümlerde kontaminasyonun tarım ilacı kullanılarak engellenmiş olabileceği ihtimalini de ortaya çıkarmaktadır. Eğer böyle bir durum varsa özellikle kabukların da dahil edildiği kırmızı şarap üretimi sırasında şaraplarda pestisit kalıntısı riski ortaya çıkabilir. Bu yüzden şaraplarda pestisit kalıntısı ile ilgili çalışmaların da yapılması faydalı olacaktır. AB uyum sürecinde oluşturulan yeni tebliğler, gıdalarda kontrollerin artırılması, üretici firmaların ihracata da yönelmesi gibi sebeplerle, üreticilerin bilinçlendiği de düşünülebilir. İhrac edilen ürünler gittiği ülkede ve gümrük birimlerinde analize alınmakta ve eğer limit değerleri aşan bulaşan tespit edilirse geri gönderilmektedir. Bu durumda ihrac eden üretici, ürününe geçtiğimiz yıllardan daha fazla dikkat etmek zorunda kalmış olabilir.

KAYNAKLAR

- Abid, S., Hassen, W., Achour, A., Skhiri, H., Maarufi, K., Ellouz, F., Creppy, E.E., Bacha, H., 2003. Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic? *Human Experimental Toxicoloji*, 22: 77-84.
- Altıokka, G., Can, O.N., Atkoşar, Z., Aboul-Enein, H.Y., 2009. Determination of ochratoxin A in Turkish wines. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17: 467-473.
- Anlı, E., Çabuk, B., Vural, N., Başpınar, E., 2005. Ochratoxin A in Turkish wines. *Journal of Food Biochemistry*, 29: 611-623.
- Assaf, H., Betbeder, A.M., Creppy, E.E., Pallardy, M., Azouri, H., 2004. Ochratoxin A levels in human plasma and foods in Lebanon. *Human Experimental Toxicology*, 23: p 495.
- Babu, E., Takeda, M., Narikawa, S., Kobayashi, Y., Enomoto, A., Tojo, A., Cha, S.H., Sekine, T., Sakthisekaran, D., Endou, H., 2002. Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1590: 64-75.
- Bacaloni, A., Cavaliere, C., Faberi, A., Pastorini, E., Samperi, R., Lagana, A., 2005. Automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spektrometry method for the determination of ochratoxin A in wine and beer. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5518-5525.
- Bayman, P., Baker, J.L., Doster, M.A., Michailides, T.J., Mahoney, N.E., 2002. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* grup and *Aspergillus alliceus*. *Applied and Enviromental Microbiology*, 68: 2326-2329.
- Berndt, O.W., Hayes, A.W., Phillips, D.R., 1980. Effects of mycotoxins on renal function: Mycotoxic nephropathy. *Kidney International*, 18: 656-664.
- Bryden, L.W., 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition*, 16: 95-101.
- Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Minguez, S., Pons, A., 2002. What is the source of ochratoksin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*, 79: 213-215.
- Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G.P., Galassi, S., 2001. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorbition treatments with commercial fining agents. *Journal and Agricultural Food Chemistry*, 49: 3917-3921.
- Chiadini, M.A., Scherpenisse, P., Bergwerff, A.A., 2006. Ochratoxin A contents in wine: Comparision of organically and conventionally produced products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7399-7404.
- Codex Alimentarius Commission FAO (Food and Agriculture Organization), WHO (World Health Organization), JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 1998.
- Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) no 466/2001 as regards ochratoxin A (Text with EEA relevance).

- Creppy, E.E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.
- Creppy, E.E., Chiarappa, P., Baudrimont, I., Boracci, P., Moukha, S., Carratù, R.M., 2004. Synergistic effects of fumonisin B₁ and ochratoxin A: Are *in vitro* cytotoxicity data predictive of *in vivo* acute toxicity? *Toxicology*, 201: 115-123.
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Dossena, A., Marchelli, R., 2004. Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. *Journal of Chromatography*, 1024: 275-279.
- Davis, N.D., Searcy J.W., Diener, U.L., 1969. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Applied Microbiology*, 1969: 742-744.
- Domijan, A.M. Ve Peraica, M., 2004. Ochratoxin A in wine. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 56: 17-20.
- Esteban, A., Abarca, L.M., Bragulat, R.M., Cabañes, J.F., 2004. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by *black Aspergilli*. *Research in Microbiology*, 155: 861-866.
- Fink-Grenmels, J., 1999. Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly*, 21: 4: 115-120.
- Flajs, D., Domijan, A.M., Ivić, D., Cvjetković, B., 2009. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control*, 20: 590-592.
- Hassen, W., Abid-Essafi, S., Achour, A., Guezzah, N., Zakhama, A., Ellouz, F., Creppy, E.E., Bacha, H., 2004. Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: respective role of ochratoxin A and possible genetic predisposition. *Human & Experimental Toxicology*, 23: 339-346.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) cas no: 303-47-9, vol 56. Ochratoxin A (group 2B), 1993.
- Il'ichev, Y.V., Perry, J.L., Simon, J.D., 2002. Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Preferential binding of the dianion and pH effects. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106: 452-459.
- Lea, T., Steien, K., Størmer, C., 1989. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 107: 153-159.
- Leong, L.S., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, A.B., Emmett, R.W., Scott, E.S., 2006a. *Black Aspergillus* species in Australian vineyards: from soil to ochratoxin A in wine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571: 153-171.
- Leong, L.S., Hocking, A.D., Scott, S.E., 2006b. The effect of juice clarification, static or rotary fermentation and fining on ochratoxin A in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12: 245-251.
- Lioli, M.B., Santoro, A., Barbieri, R., Salzano, S., Ursini, M.V., 2004. Ochratoxin A and zearalenon: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research*, 557: 19-27.
- Luchetta, G., Bazzo, I., Cortivo, G.D., Stringher, L., Bellotto, D., Borgo, M., Angelini, E., 2010. Occurrence of black aspergilli and ochratoxin A on grapes in Italy. *Toxins*, 2: 840-855.

- Maarufi, K., Zakhama, A., Baudrimont, I., Achour, A., Abid, S., Ellouz, F., Dhoub, S., Creppy, E.E., Bacha, H., 1999. Karyomegaly of tubular cells as early stages marker of the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 18: 410-415.
- Meisner, H. ve Chan, S., 1974. Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. *Biochemistry*, 13.
- Mateo, R., Medina, Á., Mateo, E.M., Mateo, F., Jiménez, M., 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 79-83.
- Murthy, P.S., Borse, B.B., Khanum, H., Pullabhatla, S., 2009. Inhibitory effects of ajowan (*Trachyspermum ammi*) ethonolic extract on *A. ochraceus* growth and ochratoxin production. *Turkish Journal of Biology*, 33: 211-217.
- O'Brien, E., Heussner, A.H., Dietrich, D.R., 2001. Species, sex and cell type specific effects of ochratoxin A and B. *Toxicological Sciences*, 63: 256-264.
- Palli, D., Miraglia, M., Saieva, C., Masala, G., Cava, E., Colatosti, M., Corsi, M.A., Russo, A., Brera, C., 1999. Serum levels of ochratoxin A in healthy adults in Tuscany: correlation with individual characteristics and between repeat measurements. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 8: 265-269.
- Peraica, M., Radić, B., Lucić, A., Pavlovic, M., 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77: 754-766.
- Petzinger, E. ve Weidenbach, A., 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, 76: 245-250.
- Petzinger, E. ve Ziegler, K., 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23: 91-98.
- Pfohl-Leszkowicz, A. ve Manderville, R.A., 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51: 61-99.
- Pitt, J. I., 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *Food Science Australia*, 56: 184-192.
- Pohland, A.E., Nesheim, S., Friedman, L., 1992. Ochratoxin A: A review. *Pure & Applied Chemistry*, 64: 1029-1046.
- Puntarić, D., Bošnjir, J., Šmit, Z., Škes, I., Baklaić, Z., 2001. Ochratoxin A in corn and wheat: Geographical association with endemic nephropathy. *Crotorian Medical Journal*, 42 (2): 175-180.
- Radić, B., Fuchs, R., Peraica, M., Lucić, A., 1997. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicology Letters*, 91: 105-109.
- Reinsch, M., Töpfer, A., Lehmann, A., Nehls, I., 2005. Determination of ochratoxin A in wine by liquid chromatography tandem mass spectrometry after combined anion-exchange/reversed phase clean-up. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381: 1592-1595.
- Rosa, C.A.R., Magnoli, C.E., Fraga, M.E., Dalcero, A.M., Santana, D.M.N., 2004. Occurance of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Jenerio, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 21: 358-364.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, É., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E., 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1306-1311.

- Schwerdt, G., Holzinger, H., Sauvant, C., Königs, M., Humpf, H.U., Gekle, M., 2007. Long-term effects of ochratoxin A on fibrosis and cell death in human proximal tubule or fibroblast cells in primary culture. *Toxicology*, 232: 57-67.
- Shephard, G.S., Fabiani, A., Stockenström, S., Mshicileli, N., Sewram, V., 2003. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1102-1106.
- Shephard, G.S., 2008. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and Contaminants*, 25(02): 146-151.
- Skaug, M.A., Helland, I., Solvoll, K., Saugstad, O.D., 2001. Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Additives and Contaminants*, 18: 321-327.
- Soleas, G.J., Yan, J., Goldberg, D.M., 2001. Assay of ochratoxin A in wine and beer by HPLC photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49: 2733-2740.
- Stander, M.A. ve Steyn, P.S., 2002. Survey of South African wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 23: 9-13.
- Stoev, S.D., 2010. Studies on carcinogenic and toxic effects of ochratoxin A in chicks. *Toxins*, 2: 649-664.
- Tatu, A.C., Orem, W.H., Finkelman, R.B., Feder, G.L., 1998. The ethiology of Balkan Endemic Nephropathy: Still more questions than answers. *Environmental Health Perspectives*, 106: 689-700.
- Trenk, H.L., Butz, M.E., Chu, F.S., 1971. Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. *American Society for Microbiology Applied Microbiology*, 21: 1032-1035.
- Türk Gıda Kodeksi, 2009. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı; Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ. Tebliğ no: 2008/26. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ. Tebliğ No: 2009/22.
- Xiao, H., Marquardt, R.R., Frochlich, A.A., Ling, Y.Z., 1995. Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 43, 524-530.
- Valenta, H., 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A*, 815: 75-92.
- Var, I. ve Kabak, B., 2007. Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines. *Microchemical Journal*, 86: 241-247.
- Varga, J., Rigó, K., Téren, J., 2000. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 1-7.

ÖZGEÇMİŞ



Adı ve Soyadı: Merve Çiçek

Doğum Yeri ve Yılı: Burdur/ 1986

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise: Burdur Anadolu Lisesi

Lisans: Ege Üniversitesi/ Fen Fakültesi/ Biyokimya Bölümü

Yüksek Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi/ Fen Edebiyat Fakültesi/ Biyoloji Ana
Bilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve yıl:

Şifa Tabii Soda ve Mesrubat LTD. ŞTİ. 2009

Hastel Gıda LTD. ŞTİ. 2009-2010