



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SAKARYA İLİ VE ÇEVRESİNDE ÇİĞ NATUREL
FINDIKLARDA MAYA, KÜF TESPİTİ VE HPLC YÖNTEMİ İLE
AFLATOKSİN TİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Samet KORKMAZ
Veteriner Hekim**

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat YILDIRIM**

KIRIKKALE – 2023

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Samet KORKMAZ

04/01/2023

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen, yetişmemde büyük emeği geçen, bilgi birikim ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Murat YILDIRIM'a;

Tez izleme komitemde yer alan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Serkal GAZYAĞCI'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Sibel KIZIL'a;

Arkadaşlığı ve yardımları için değerli dönem arkadaşlarım Dr. Bilge İŞLEK SELVİ, Dr. Elif BULUT, Dr. Mehmet ÜVEY ve Dr. Efsun Melike ÇEÇEN'e;

Katkılarından dolayı Doç. Dr. İrem GÜLAÇTI;

Katkılarından dolayı Sakarya Ticaret Borsası Nisan 2018/Kasım 2022 Yönetim Kurulu Üyeleri ve çalışma arkadaşlarıma;

Katkılarından dolayı ATB Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı çalışma arkadaşlarım Tuğba Kökümer ve Bahar Duygu Kubilay'a ;

Hedeflerime giden bu yolda sevgisi, sabrı ve güler yüzüyle yolumu aydınlatan, bana her zaman destek olan, biricik eşim, en iyi arkadaşım Doç. Dr. Müge ÖZÇELİK KORKMAZ'a;

Hayat enerjim, evimizin neşesi canım kızlarım İpek KORKMAZ ve Simge KORKMAZ'a;

Beni bugünlere getiren, sevgi ve fedakârlıklarını derinden hissettiğim annem Hafize KORKMAZ, babam Ferahim KORKMAZ ve Kayınvalidem Şengül ÖZÇELİK'e;

Bu süreçte her zaman yanımda olan kıymetli aileme ve arkadaşlarıma;

Teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Sakarya – 2023

Samet KORKMAZ

ÖZET

SAKARYA İLİ VE ÇEVRESİNDE ÇİĞ NATUREL FINDIKLARDA MAYA, KÜF TESPİTİ VE HPLC YÖNTEMİ İLE AFLATOKSİN TİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyolojisi, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Murat YILDIRIM

Ocak 2023, 73 sayfa

Bu araştırmada Sakarya ili ve çevresinde yetiştirilen fındıklarda aflatoksin varlığının incelenmesi, bu tespitte kullanılan iki temel yöntemin karşılaştırılması amaçlanmıştır. İhraç edilen ham doğal fındıklarda küf ve maya varlığını gösteren aflatoksin tayini sıklıkla HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemi kullanılarak yapılmaktadır. Ancak klasik yöntemle aflatoksin varlığının teyit edilmesi genellikle uygulanmamaktadır. Bu amaçla 102 örnek için HPLC yönteminin yanısıra klasik besi yeri yöntemi ile yapılan çalışmamızda, Dikloran Gliserol Agar (DG 18) besiyerine yapılan ekimlerin 74'ünde (%72,54) üreme tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak en sık görüleni *Penicillium* spp. olarak belirlendi ($p<0.05$). Üreme meydana gelen koloni sayılarına bakıldığında tür tayini açısından en çok tespit edilen tür *Penicillium* spp. olarak belirlendi. Diğer türlere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$). Maya-küf tespitini gösterme yönteminin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha etkili olduğu belirlendi ($p<0.05$). Aflatoksin düzeyinin belirlenebilmesi için HPLC yöntemi ile yapılan 102 örnekle çalışmamızda elde edilen değerlerin belirlenen limitlerin altında olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen maya küf analiz sonuçlarının yüksekliği, fındıkların işlenmesi esnasında kontaminasyon riskinin olması ve depolama koşullarının uygun olmaması durumunda toksin üretimini arttırabileceği için gerekli önlemlerin alınması, gerekirse endüstriyel sistemlerin kullanılarak bu riskin azaltılması halk sağlığı açısından uygun olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Fındık, HPLC, Maya-Küf, Aflatoksin

ABSTRACT

INVESTIGATION OF AFLATOXIN TYPES BY YEAST, MOLD DETECTION
AND HPLC METHOD IN RAW NATURAL HAZELNUT IN SAKARYA AND
ITS SURROUNDINGS

Kirikkale University

Health Sciences Institute

Veterinary Microbiology, Doctoral Thesis

Advisor: Prof. Dr. Murat YILDIRIM

January 2023, 73 pages

In this study, it was aimed to examine the presence of aflatoxin in hazelnuts grown in and around Sakarya province and to compare the two basic methods used in this determination. Determination of aflatoxin, which indicates the presence of mold and yeast in exported raw natural hazelnuts, is often performed using HPLC (High Performance Liquid Chromatography) method. However, confirmation of the presence of aflatoxin by the classical method is not generally applied. For this purpose, in our study performed with HPLC method for 102 samples, as well as with the classical medium method, growth was detected in 74 (72.54%) of the sowings made on Dichloran Glycerol Agar (DG 18) medium. Statistically the most common *Penicillium* spp. was determined as ($p < 0.05$). Considering the number of breeding colonies, *Penicillium* spp. was determined as. It was statistically significantly higher than other species ($p < 0.05$). In order to determine the level of aflatoxin, it was determined that the values obtained in our study with 102 samples, which were carried out by HPLC method, were below the determined limits. Since the high level of yeast and mold analysis results obtained in the study, the risk of contamination during the processing of hazelnuts and the unsuitable storage conditions may increase toxin production, it will be appropriate for public health to take necessary precautions and to reduce this risk by using industrial systems if necessary.

Keywords: Hazelnut, HPLC, Yeast-Mold, Aflatoxin

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	2
1.1. Mikotoksinlerin Tarihçesi.....	5
1.2. Mikotoksinler.....	9
1.3. Aflatoksinlerin Özellikleri.....	9
1.4. Maya ve Küflerin Özellikleri.....	18
1.5. Aflatoksinler İçin Kullanılan Analiz Yöntemleri.....	19
1.5.1. BGYF (Parlak Yeşilimsi-Sarı Floresans) Metodu.....	20
1.5.2. Florimetrik Metot.....	20
1.5.3. İnce Tabaka Kromatografisi.....	21
1.5.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Cihaz Özellikleri.....	22
1.5.5 İmmuno Kimyasal Yöntemler.....	26
1.6. Küf ve Maya Sayımı – Koloni Sayımı Tekniği – ISO 21527-2 Laboratuvar İnceleme Yöntemleri.....	28
1.6.1. Standart Analiz Yöntemi.....	28
1.6.2. Özel Grupların Sayımı.....	30
1.7. Kullanılan Besiyerleri.....	31
1.7.1. Maya Özü Glikoz Kloramfenikol Agar (Merck 1.16000).....	31
1.7.2. Malt Ekstrakt Agar (Merck 1.05398).....	31
1.7.3. Patates Dekstroz Agar (Merck 1.10130).....	31

1.7.4. %50 Glikoz Suyu.....	32
1.7.5. Oksitetrasiklin Glikoz Maya Agar (Merck 1.10877).....	32
1.7.6. Wort Agar (Merck 1.05448).....	33
1.7.7. Rose Bengal Kloramfenikol Agar (Merck 1.00467).....	33
1.7.8. Dikloran Rose Bengal Kloramfenikol Agar (Merck 1.00466).....	33
1.7.9. Dikloran Gliserol Agar (Merck 1.00465).....	34
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
2.1. Numune Alınması.....	35
2.2. Numune Hazırlanması.....	35
2.2.1. Küf ve Maya Sayımı – Koloni Sayımı Tekniği – ISO 21527-2.....	35
2.2.1.1. Mikroskopik İnceleme.....	39
2.2.1.2. Tür Tayini.....	39
2.2.2. HPLC Yöntemi ile Aflatoksin Tayini.....	39
2.3. İstatiksel İnceleme.....	42
3. BULGULAR.....	43
3.1. Küf ve Maya Sayımı – Koloni Sayımı Tekniği – ISO 21527-2 İnceleme Sonuçları.....	43
3.2. HPLC Yönteminin Sonuçları.....	45
3.3. İstatiksel Değerlendirme Sonuçları.....	45
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	48
KAYNAKLAR.....	54
EKLER.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. TLC cihazı.....	21
Şekil 1.2. HPLC cihazı.....	24
Şekil 1.3. Floresan detektörlü bir HPLC cihazında iki ayrı dalga boyu.....	26
Şekil 2.1. Bütün gıdalarda küf maya sayımı akış şeması.....	38
Şekil 3.1. <i>Penicillium</i> spp. Boyamada laktofenol mavisi kullanılmış ve görüntüler 100X lens ile çekilmiş, görüntüleme cep telefonu kullanılmıştır, makroskobik görüntü.....	43
Şekil 3.2. <i>Aspergillus fumigatus</i> , Boyamada laktofenol mavisi kullanılmış ve görüntüler 100X lens ile çekilmiş, görüntüleme cep telefonu kullanılmıştır, makroskobik görüntü.....	43
Şekil 3.3. <i>Aspergillus niger</i> , Boyamada laktofenol mavisi kullanılmış ve görüntüler 100X lens ile çekilmiş, görüntüleme cep telefonu kullanılmıştır, makroskobik görüntü.....	44
Şekil 3.4. <i>Aspergillus flavus</i> , Boyamada laktofenol mavisi kullanılmış ve görüntüler 100X lens ile çekilmiş, görüntüleme cep telefonu kullanılmıştır, makroskobik görüntü.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Canlıların üzerinde oluşturdukları etkilere göre Mikotoksin çeşitleri.....	7
Çizelge 1.2. Gıdalarda görülen başlıca mikotoksinler ve türleri.....	9
Çizelge 1.3. Avrupa ve Amerika’da gıdalar için belirlenmiş en yüksek mikotoksin ve aflatoksin değerleri.....	12
Çizelge 1.4. Türkiye’de gıda maddelerindeki en yüksek mikotoksin ve aflatoksin değerleri.....	14
Çizelge 3.1. Besi yeri tekniğine göre saptanan türlerin üreme gerçekleşen besi yeri toplam sayısı üzerinden sayı ve yüzde dağılım oranları.....	44
Çizelge 3.2. İstatiksel değerlendirme özet.....	45
Çizelge 3.3. Türlerin koloni sayılarına göre ortalama değerleri.....	46
Çizelge 3.4. İstatiksel analiz sonuçları.....	46
Çizelge 3.5. Ki kare testi ile türlere göre koloni sayılarının dağılımı.....	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µl	mikrolitre
nm	nanometre
ng	nanogram
ml/dk	mililitre/dakika
ppb	ng/ml
Ab	Antikor
AF	Aflatoksin
AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFM1	Aflatoksin M1
AFM2	Aflatoksin M2
Ag	Antijen
AOAC	Resmi Analitik Kimyacılar Derneği
BGYF	Parlak yeşilimsi sarı floresans
BW	Body weight
DG18	Dichloran %18 (mass concentration) glyserol agar
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMS	En muhtemel sayı
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IAC	İmuno Affinite Kolonu

IFU	Uluslararası Meyve Suyu Federasyonu
OTA	Okratoksin A
PBS	Fosfat tamponu
RIA	Radio Immuno Assay
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
TGK	Türk Gıda Kodeksi
UV	Ultraviyol
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



1. GİRİŞ

Mikotoksinler, çeşitli mantar türleri tarafından sentezlenen, insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilen ve hatta kronik zehirlenmelere yol açabilen metabolik ürünlerdir.

Mikroorganizmalardan olan maya ve küfler hemen her ortamda bulunur uygun şartlar geliştiğinde zararlı olan metabolitler üretirler. Kanserle sebep olan türleride bulunan bu metabolitlere “Mikotoksin” denir (Sabuncuoğlu, Baydar, & Giray, 2008). Türkiye’de mikotoksinler açısından ilk sorun 1967 yılında ihraç edilecek olan 10 ton iç fındıkla ilgili olarak yaşanmıştır. Bu fındıklarda yüksek oranda aflatoksin tespit edilmiş ve ülkemize geri iade edilmiştir. Bunun üzerine bu konu ile ilgili ayrıntılı çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Demir ve Ark. 2002). Mikotoksinler arasında aflatoksinler en güçlü biyolojik karsinojenler olarak kabul edilmektedir (Günşen ve Büyükyörük, 2003). Aflatoksijenik küfler kontaminasyon sonucu bulaştıkları gıda ürünlerinde uygun nem ve sıcaklık buldukları anda aflatoksin geliştirir ve üretirler. Üründe toksik küfler bulunmasına rağmen aflatoksin her zaman görülmezken sağlıklı görünen ürünlerde bile aflatoksin bulunabilir. Aflatoksinlerin ağırlıklı olarak küflü gıdalarda görüldüğü ve doğrudan insan tüketimi için üretilmiş gıdalarda da bulunabileceği bilinmektedir. Çeşitli adjuvanların bunu tamamen ortadan kaldıramadığı, hayvan yemlerinde bulunan aflatoksinlerin de insan sağlığı için tehlike oluşturabileceği ve hayvansal gıdalardan elde edilen ürünlerin de insan sağlığını tehdit ettiği belirtilmektedir. Çok az miktarda da olsa et, süt ve yumurta gibi ürünler bunların başlıcalarıdır (Gürses ve diğerleri, 2004). Aflatoksinler B1, B2, G1, G2 olarak 4 ana gruba ayrılır ancak aflatoksin B1 ve G1 kanserojen olarak bilinir (Amdur, M. ve diğerleri, 1993). Aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksinler içerisinde en iyi bilinen toksindir (İnal, T, 1990). *Aspergillus* spp. tarafından açığa çıkarılan bazı metabolitler toksik ve kanserojeniktir (Leontopoulos ve ark., 2003). AFB1 ve AFB2 içeren diyetleri tüketen emziren hayvanlar, bu toksinleri hidrosillenmiş metabolitler olan aflatoksin M1 (AFM1) ve aflatoksin M2’ye (AFM2) dönüştürür (Beltz, R. M., & Spain, J. N., 1998).

Aflatoksinin doğal oluşumunda birçok fiziksel ve biyolojik faktör bulunmaktadır. Bunlar arasında mevsim koşulları, ısı ve rutubet oranı önemli faktörler arasındadır.

(Demir ve ark. 2002). Bisfuruna kumarin yapısında yer alan ve *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerine ait küf mantarlarının ürettiği toksik küf metabolitinin adıdır (Demir ve ark. 2002). Ayrıca *Penicillium* ve *Fusarium* cinsine ait mantarların gıda ve yemlerde kullanılması, toksik bileşikler üretir. (Şen, L, ve Nas, S, 2010). Şimdiye kadar, B1'in en toksik ve ışığa duyarlı olduğu sekiz farklı türev tanımlanmıştır. (Tiryaki ve ark. 2011).

Ülkemizde ihracat ekonomisine katkı sağlayan en önemli kaynaklardan biri fındık yetiştiriciliğidir. Isı ve rutubet gibi çevresel faktörlerin aflatoksin oluşumunu etkilediği çok iyi bilinen bir gerçektir (Özay ve diğerleri, 2008; Northolt ve diğerleri, 1976; Chiou ve diğerleri, 1984; Denizel ve diğerleri, 1976a,b). Fındıkta kabuk, mikroorganizmalar ve küfe karşı oldukça iyi bir bariyer oluşturur (Bayman ve diğerleri, 2002; Campbell ve diğerleri, 2003). Ancak kabuklu ürünlerde aflatoksin oluşum ve kontaminasyon düzeyini belirleyen faktörler; kabukların böcekler veya diğer faktörler tarafından zarar görmesi, toprakla temas, saklama koşulları, kurutma sırasındaki ısı ve rutubet gibi faktörlerdir. Bu faktörler aflatoksin gelişim riskini oldukça artırır. Bütün bu nedenlere bağlı olarak gıdaların toksijenik küflerle kontaminasyonunu önlemek ve saklama koşullarını uygun hale getirmek, aflatoksin oluşum riskini azaltmanın en etkili yolu olarak karşımıza çıkmaktadır (Magan ve Olsen, 2004; Barung ve diğerleri, 2006). Aynı zamanda kontamine gıdanın tespit edilmesi (Sakai ve ark., 1984), depolama süresinin iyi ayarlanması, böcek istilasının engellenmesi, kabuk hasarının önlenmesi küf gelişimi ve toksin oluşumu riskini azaltacaktır. (Schatzki ve Ong, 2001; Campbell ve diğerleri, 2003). Yine bu faktörlerin etkileşimi ile, küf gelişimi sonrası toksin üretim süreci ve zamanı değişebilir. Bu nedenle eğer bir gıdada küf gelişimi tespit edilmişse, kontamine olmuş tahılların diğer tahıllardan ayrılması ve uzaklaştırılması farklı aşamalara bağlıdır. Yer fıstığı (Schatzki ve Pan, 1996, 1997) ve bademde (Almond Board Report Summary, 2002) kabuklu yemişlerdeki aflatoksin riskinin azaltılmasında ilave işlemlerin etkisi üzerine kapsamlı araştırmalarda yapılmıştır.

Kuruyemiş sanayi ve gıda sanayinde sıklıkla kullanılan fındık ve yan ürünleri son zamanlarda veteriner hekimlikte de hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Yağı alınarak işlenen fındığın küspesi protein açısından oldukça zengindir. (Doğan G, Bircan R, 2010) Ülkemizde fındık yetiştiriciliğinin büyük katma değer oluşturması ve fındık rekoltesinin yüksek olması nedeniyle sağlıklı hayvansal gıda üretiminde

önemli bir role sahip olacağı bilinmektedir. Fındık işlenmesi esnasında yapılan işlemler: fındığın tarladan elle toplanması, nakliyesi, fındık kapsülünün soyulması, kurutulması, taşınması, kırılması, ağartılması, kavrulması ve depolanması gibi birçok aşamalardan geçmektedir. Bu aşamalar esnasında fındık kontaminasyona uğramakta ve birçok maya ve küf ile kontamine olmaktadır. Bunun yanı sıra kontamine olan fındığın uygun koşullarda depolanmaması toksin oranlarının artmasına sebep olabilmektedir. Fındığın depolanması ve işlenmesine kadar geçen süreçte önemli olan, belirlenmiş kritik kontrol noktalarının gözden kaçırılmadan uygulanmasının sağlandığından emin olunmasıdır. Bu nedenle işlenmesi ve depolanması aşamalarında kontaminasyona sebep olabilecek noktalarda kontrol ve tedbirler ne kadar sık yapılırsa maya küf oranlarının düşürülmesi toksin varlığının azaltılması için faydalı olacaktır.

Depolamada Kullanılacak Alanların özellikleri;

- Serin ve kuru yerde muhafaza edilmelidir.
- Direkt güneş ışığına maruz bırakılmamalı ve nem yayması engellenmelidir.
- Su basmasını önlemek için deponun tabanı yerden yüksek olmalıdır.
- Depo üzerindeki tavan ve çatılar sızdırmayacak şekilde ısı değişimlerinden etkilenmeyecek şekilde yalıtılmalıdır.
- Pis su borusu ve lavabo bulunan yerler depolama amaçlı kullanılmamalıdır.
- Depolama odasının bağıl neminin %70'i geçmemesi sağlanmalıdır.
- Uzun süreli saklama için mümkünse saklama sıcaklığı 0-10 °C olmalıdır.
- Deponun kapıları, pencereleri ve diğer bölümleri kirlenmeyi ve zararlı girişleri önleyecek şekilde tasarlanmalıdır.
- Depo zemininde ızgara olmalı, ızgaralara 10'dan fazla torba konulmamalı ve istifler arasında boşluk bırakılmalıdır. İstiflenmiş çantalar, saklama duvarından 10 cm uzakta olmalıdır.
- Fındıklar çeşidine ve hasat yılına göre ayrılarak jüt veya file çuvallarda saklanmalıdır.
- Fındıklarda özellikle entegre tesislerde uzun süreli depolamalarda depolama öncesi nem, gizli çürüklük, toplam küf ve aflatoksin analizleri yapılmalıdır.
- Muhakkak en az ayda bir kez gerekli kontroller yapılmalıdır.
- Depolama, yığın halinde ve üst üste çok sayıda torbada olmamalıdır.
- Fındık, özellikle dökme depolamada havasız hale gelebilir ve küf gelişimi için uygun bir ortam oluşturabilir.

Bu hem ihracatımızı sekteye uğratabacak hem de ülkemizin dış ticaretteki itibarını zedeleyecektir. Fındık ihracatını zorlaştıran bu durum aynı zamanda hem ülke ekonomisine hemde fındığın ekonomik değerine zarar vermektedir. Bu da beraberinde pazar sorunlarını getirmektedir.

Fındıkta mikrobiyolojik çalışmalarda ülkemiz için sınırlı sayıda bilimsel yayın bulunmaktadır. Bu tez ile fındık mikrobiyolojisi hakkında bilgi oluşturulacak ve bundan sonraki çalışmalarda önemli bir kaynak olacaktır.

1.1. Mikotoksinlerin Tarihçesi

Orta Çağ Avrupası'nda mikotoksikozis vakaları açısından bilinen en eski olay *Claviceps purpurea* adıyla bilinen kutsal ateş olarak tanımlanır. Ergotizm, toksinlerle enfekte olmuş çavdar yemenin sonucudur (Vural, N., 1992). Ergotizmi anlatan ilk kayıtlar Orta Çağ'a aittir. Hastalığa neden olan bileşik, halüsinojenik etkilere sahip ergot alkaloidleridir. Orta Çağ'da hastalığın en yaygın olduğu dönemler insanlar kiliselere akın ederlerdi, buradaki bozulmamış tahılları tüketerek hastalıktan kurtulurlar ve bunu kilisenin bir mucizesi olarak kabul ederlerdi (Uylaşer ve Başoğlu, 1992). Mikotoksikozis açısından tarihteki bir önemli başka bir olay ise, Rusya'da ikinci dünya savaşı esnasında görülmüştür. Depolarda saklanan tahılların bozulması ile bu besinleri tüketen kişilerde ölümler gözlenmiştir (Papp ve ark., 2002).

Mikotoksinler uzun süredir bilinmesine rağmen deneysel araştırmalar 1940'lı yıllarda başlamıştır. *Fusarium* spp. suşları kullanılarak deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, *Penicillium* spp.'nin sarı pirinçten Japonya'da izole edilmesi ile başlamıştır (İnal, T, 1992). *Fusarium* spp. ve *Penicillium* spp.'nin sebep olduğu ergotizm gibi mikotoksikoz türleri ve *Penicillium* spp.'nin sebep olduğu sarı pirinç zehirlenmesi, bu türlerin geçmiş dönemlerde Rusya, Japonya hatta Avrupa'da bile salgınlara sebep olmasının başlıca sebeplerindedir (Ünlütürk ve Turantaş, 1999).

Küflü gıdalarla beslenmenin hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin ilk örnekleri 1950'lerde Amerika Birleşik Devletleri'nde görülen olgularla bildirilmiştir. Küflü mısır ile beslenen domuzlarda ve küflü mısırın karıştığı diyetlerle beslenen ev köpeklerinde öldürücü hepatit vakaları akut olarak seyretmiştir. Küflü diyet ve küflü hayvan yemlerinden alınan örneklerde *Aspergillus flavus* ve *Penicillium rubrum* izole edilmiştir (Sert, S., 1985). 1960'lı yıllarda karaciğer nekrozuna sebep olarak

ortaya çıkan (Hindi X Hastalığı) ve 100.000'den fazla kanatlıının itlaf edilmesine sebep olan hastalıkla ilgili yapılan çalışmalarda ilk kez aflatoksikozis tespit edilmiştir (Dwayne ve Thrasher, 2005). Yapılan çalışmalarda bu ölümlü vakaların Brezilya'dan getirilen fıstık ezmesinden kaynaklandığı anlaşılmıştır (Arda, 1975). Yapılan çalışmalara bakıldığında, bu etken maddelerin tavuk ve ördek yavrularında da zehirlenmelere neden olduğu görülmüştür. Ortaya çıkan hastalık tablosunda, akut hepatit, akut iştah kaybı, nekroz, safra kanalı hiperplazisi, güçsüzlük ve uyuşukluk gibi semptomlarla karakterize olduğu görülmüştür (Eaton ve Groopman, 1994). Hindistan'da 400 kişinin zehirlendiği bir aflatoksikoz olayı, 106 kişinin ölümü ile sonuçlanmıştır. Bu olay sonrasında alınan mısır örneklerinden yapılan araştırmalarda yüksek oranlarda aflatoksin kalıntısı bulunmuştur (Kaya ve ark., 2002) (çizelge 1.1.). Türkiye'de ise aflatoksin vakaası olarak ilk bilimsel yayınlar, 1960'lı yıllarda gündeme gelmiştir.

Çizelge 1.1. Canlıların üzerinde oluşturdukları etkilere göre Mikotoksin çeşitleri (Kaynak: Kaya, 2001)

Mantar Çeşidi	Mikotoksinler	Kaynaklar	Hedef organ, doku ve oluşan etki	Etkilenen canlılar
<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>P. puberulum</i>	Aflatoksinler	Tahıllar, yemler, yağlı tohum küspeleri	Karaciğer; gelişme hızı ve verimde azalma; sarılık, kanama, sürgün, karaciğer kanseri, bağışıklık sisteminin baskılanması	Tüm hayvan türleri ve insanlar
<i>A. ochraceus</i> <i>P. viridicatum</i>	Okratoksinler	Tahıllar, otlar	Karaciğer ve böbrek hasarı, iştah kaybı, sürgün, bağışıklık sisteminin baskılanması	Kanatlılar ve insanlar
<i>P. rubrum</i>	Rubratoksinler	Tahıllar, baklagiller, yağlı tohumlar	Aflatoksinlere benzer etki gösterirler	Tüm hayvan türleri
<i>F. roseum</i> ve diğer <i>Fusarium</i> türleri	Zearelonon	Tahıllar	Östrojenik etki	Gevişenler ve domuzlar
<i>P. citrinum</i>	Sitrinin	Tahıllar	Sinirsel belirtiler, sürgün, gelişme geriliği, karaciğer ve böbrek nekrozu, kalp ve iskelet kasında miyopati, karaciğer kanseri	Kanatlılar ve domuzlar
<i>A. versicolor</i> <i>A. nidulans</i>	Aspertoksin Sterigmatosistin	Tahıllar, pirinç, yemler	Karaciğer kanseri	Tüm hayvan türleri
<i>A. clavatus</i> <i>P. patulum</i>	Patulin	Silaj, elma, yemler	Sinirsel belirtiler, beyin kanaması, deri kanseri	Sığırlar
<i>A. ochraceus</i> <i>P. puberulum</i>	Penisilik asit	Tahıllar, mısır	Deri kanseri, kanamalar	Tüm hayvan türleri
<i>Fusarium</i> , <i>Trikoderma</i> , <i>Sefalosporium</i> vb.	Trikotesenler	Tahıllar, yemler	Dermatit deride nekroz, kanamalar, anemi, granülositopeni vb.	Tüm hayvan türleri
<i>P. citreoviridae</i>	Streoviridin	Pirinç, tahıllar	MSS, kalp ve solunum felci, çarpınmalar	Tüm hayvan türleri
<i>F. tricinctum</i>	Butenolid	Mısır, ot, tahıllar	Bacaklarda gangren, kuyrukta nekroz	Sığırlar
<i>P. islandicum</i> <i>P. rugulosum</i>	Sikloklorotin Luteoskirin Rugulosin	Pirinç	Karaciğer hasarı, kanseri	Kanatlılar
<i>S. bakeri</i>	Sporidesminler	Tahıllar, ot	Karaciğer hasarı, safra kanalı tıkanması, ışığa aşırı duyarlılık	Gevişenler
<i>Penicilium</i> türleri	Penitremler	Tahıllar	Kas titremeleri, felç, çarpınmalar	Tüm hayvan türleri

Çizelge 1.1. Canlıların üzerinde oluşturdıkları etkilere göre Mikotoksin çeşitleri (Kaynak: Kaya, 2001)(devamı)

Mantar Çeşidi	Mikotoksinler	Kaynaklar	Hedef organ, doku ve oluşan etki	Etkilenen canlılar
<i>Acremonium loliae</i>	Lolitremler	Çavdar vb.	Tremorlar, hareket düzensizlikleri, çırpınmalar, şok, spazm	Gevişenler, at
<i>Fusarium türleri</i>	Fuminosinler	Mısır	Beyin ve akciğer yangısı	At, domuz, kanatlılar
<i>Fusarium solanii</i>	4-ipomeanol	Küflü tatlı patates	Akciğer ödemi, pnömoni, amfizem	Sığır
<i>A. flavus</i> <i>A. oryzae</i>	Kojik asit	Mısır	Çırpınmalar, ödem	Tüm hayvan türleri
<i>A. niger</i> <i>A. oxalicum</i>	Okzalik asit	Bitkiler	Mide irkiltişi, MSS ve böbrek hasarı, kanama, kan kalsiyum düzeyinde azalma	Tüm hayvan türleri
<i>C. purpurea</i> <i>C. paspali</i>	Ergot alkaloidler	Tahıllar	Kuru gangren, aşırı uyarı, kanın pıhtılaşması	Tüm hayvan türleri
<i>Stachybotrys atra</i>	Satratoksinler	Tahıllar, otlar	Kemik iliği, deri, mukozalar	Tüm hayvan türleri
<i>Aspergillus</i> , <i>Zygosporium</i> <i>Nigrosabulum vb.</i>	Sitakalasanlar		Hücre zarları, pıhtılaşma, fagositoz vb.	Tüm hayvan türleri
<i>A. terreus</i>	Territremler	Tahıllar, otlar	MSS, tremor, nöromusküler kavşaklar	Tüm hayvan türleri
<i>S. sclerotiorum</i>	Psoralenler	Kereviz vb.	Deri yangısı	Tüm hayvan türleri

1.2. Mikotoksinler

Başlıca önemli mikotoksin cinsleri *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* olarak bilinmektedir (Çizelge 1.2.). Bu dört cins tarafından oluşturulan ana mikotoksinler tabloda gösterilmektedir. Aflatoksin grubundaki türevler 18 civarındadır. Okratoksinlerde yapısal benzerlik gösteren 7 bileşik içerir. Bunlardan en önemli olanı Okratoksin A (OTA)'dır. 150 bileşiğin bu gruba dahil olduğu Trikotosenler ise 40 türev içerir. *Alternaria* toksinleri ayrıca 30'dan fazla farklı metabolit sergiler (Anon., 2006)(Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.1. Gıdalarda görülen başlıca mikotoksinler ve türleri(Kaynak: Anon., 2006)

Aspergillus Toksinleri	Penicillium toksinleri	Fusarium toksinleri	Alternaria toksinleri
Aflatoksinler	Sitrinin	Zearalenon(F-2toksin)	Alternariol
AFB1	Okratoksin A		Alternariol mono metil-eter
AFB2	Sitreoviridin	Trikotesenler	
AFG1	Rubratoksin A	Deoksinivalenol	Altertoksin
AFG2	Rubratoksin B	Nivalenol	Tenuazonik asit
AFM1	Patulin	Diasetoksisirpenol	
AFM2	Penisilikasit	T-2 toksin	
AFB2a	P-R (Pen.requeforti)-toksin	HT-2 toksin	
AFG2a	Luteosikrin	Tremortin	
AFB3	İzlanditoksin	Fumonisin B1	
Aspertoksin	Ksantosilin-X	Moniliformin	
Sitrinin	Siklopiazonikasit		
Sterigmatosistin	Sitromitesin		
Okratoksin A	Rugulosin		
Patulin	Ksantomegnin		
Penisilikasit	Rugulovasin A		
	Rugulovasin B		
	Verrukulotoksin		
	Emodin		

1.3. Aflatoksinlerin Özellikleri

Aflatoksinler en toksik mikotoksinler arasındadır ve bu türlerin içerisinde *Aspergillus flavus* sonrasında *Aspergillus parasiticus* en önemli metabolit üreten türlerdendir (Bennet ve Papa, 1988). Aflatoksinlere bağlı oluşan küfler başta yer fıstığı, baharat

ve incir olmak üzere birçok gıdada bulunur (Farber ve ark., 1997). *A. flavus* dünya çapında daha yaygındır. *A. parasiticus* tropikal ve subtropikal iklimlerde daha yaygın olup her ikisi de toprakta oldukça sık bulunur. Bunun yanında canlı ya da ölü hayvan ve bitkilerde, havada da bulunabilirler (Anon., 2006). Aflatoksin üreten küfün varolduğu herhangi bir gıdada uygun ortam bulduklarında toksin açığa çıkarabilirler. En yaygın ve iyi bilinen aflatoksinler B1, B2, G1, G2, M1 ve M2 olmasına rağmen *Aspergillus flavus*'u sadece aflatoksin B1 ve B2 üretirken, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus 21 nomius* hem aflatoksin B1 ve B2 hem de aflatoksin G1 ve G2 üremesine sebep olabilmektedir. Bu grubun en toksik ve kanserojenik olanı B1'dir (Stubblefield ve Shannon, 1974; Van Egmond, 1989; Pittet, 1998; Creppy, 2002).

Bunların arasında aflatoksin B1, gıdalarda en yaygın olanıdır, insanlar ve hayvanlar üzerindeki toksik ve kanserojenik etkileri açısından tehlikeli bir tür olarak kabul edilir (Franco ve diğerleri, 1998; Yiannikouris ve Jouany, 2002; Williams ve diğerleri, 2004). İnsanlar ve hayvanlar üzerindeki toksizojenik etkilerine bakıldığında sıralama B1-M1-G1-B2-M2-G2 şeklinde olacaktır ancak her tür ve cinste farklılık gösterebilirler (Seyrek, K. 2001; Verma, 2004).

Aflatoksinlerin yapılarını araştırmak için ortaya koyulan kimyasal araştırmalarda bu maddelerin bifuran halkalı heterosiklikler olduğu görülmüştür (Heatchcote, 1984). Aflatoksinlerin iki ana metabolitinin olduğu ve bunların B1-G1 olmasının yanısıra kimyasal yapılarına görede iki ana gruba ayrıldıkları bildirilmektedir. İlk Grup difurankumarin siklopentanon yapısındadır B1, B2, B2a, M1, M2, M2a ve Aflatoksikol bu grupta yer alır. İkinci grup difuranokumarin lakton yapısındadır G1, G2, G2a, GM1, GM2, GM2a, B3 ise bu grupta yer alır. B1, B2, G1, G2 gıdalarda daha yaygın olmakla birlikte doğrudan toksijenik suşlar tarafından sentezlendiği bildirilmiştir (Heatchcote, 1984). Süt ve süt ürünlerinde kısa formları olan M1 ve M2 olan B1 ve B2'nin (Heatchcote, 1984), süt veren hayvanlar tarafından aflatoksin bulaşmış yemlerle beslenmesiyle üretilir (Quillien, 2002) ve hayvanların süt, idrar ve dışkıında yer alır (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Aflatoksinlerin toksik etkileri belirlenirken ve dünyanın farklı bölgelerinde yetişen gıda ürünlerinde aflatoksin oluşması gözlemlenmiş bu toksinlerin özellikle bazı gıda ürünlerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Dağılımına bakılacak olursa başlıcaları; yağlı tohumlarda; yer fıstığı, fındık, badem, antep fıstığı, pamuk çekirdeği, ayçiçeği,

baharatlarda; kırmızı biber, karabiber, kuru meyvelerde; Üzüm, incir, kayısı gibi tahıllarda; mısır, buğday, arpa, pirinç ve süt, süt ürünleri olduğu bildirilmektedir (Tosun, N., 1996).

Besinlerde adı geçen süt ürünleri, et ürünleri, tahıllar, kuru meyveler, yağlı tohumlar ve hatta baharatlarda göz önünde bulundurulduğunda insan ve hayvan sağlığı açısından tüketilen bütün gıdaların aflatoksin üretimine sebep olan etkenlerle kontamine olması mikotoksinlerin tarihçesi ve önemini bir kez daha vurgulamaktadır (Tunail, 2000; Özmenteşe, 2002; Yiannikouris ve Jouany, 2002; Agag, 2004). Depolama süresinde depolanacak ürünün üzerindeki zararlıların yoğunluğu, depolama yapılan şehrin iklimine bağlı olarak değişkenlik gösteren bağıl nem oranı ve hava sıcaklıkları, depolama alanının çevre ve diğer zararlılarla olan teması gibi konuların tamamı toksin oluşumunda son derece etkili ve dikkat edilmesi gereken konuların başında gelmektedir. *Aspergillus* spp. aflatoksin üretebilmesi için optimum şartlara bakıldığında depolama sıcaklığının 25°C ile 30 °C ve bağıl nemin % 85'in üzerinde olmasının yeterli olduğu yapılan araştırmalarda ortaya koyulmuştur (Denizel 1979, Aytaç 1983). Diğer taraftan ürünlerin depolara girişleri esnasında kendi bünyelerinde barındırdıkları nem oranlarının; buğdayda %17 ile %18, unda %16, mısırdaki %16 ile %25 ve pirinçte %20 ile %22'lik nem aralığında ya da üzerinde olması toksin oluşmasını hızlandıran sebeplerin başında gelmektedir (Ciegler ve ark. 1971). Hayvanlarda akut toksisite üzerine yapılan birçok çalışmada aflatoksin B1'in hepatokarsinoma neden olduğu tespit edilmiştir. İnsanlarda yer fıstığı ve yer fıstığı ürünlerinin tüketiminin insan karaciğer kanseri riskini arttırdığı gözlemlenmiştir. Aflatoksinlerin bu tehlikelerinden dolayı dünyada gıda ve yemlerde kabul edilebilir en yüksek seviyeler açıklanmıştır (Franco ve ark., 1998; Özmentese, 2002). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), bugüne kadar herhangi bir maruz kalma düzeyi belirlenmediğinden, aflatoksin M1 risklerini en aza indirmek için tüketimin minimumda tutulmasını önermektedir. Gıdalardaki aflatoksin riskine karşı birçok ülkede özellikle süt ve süt menşeyli ürünlerde izin verilen maksimum aflatoksin M1 seviyelerini belirlemiştir (Lopez ve diğerleri, 2001; Van Egmond ve Jonker, 2004). Avrupa ve Amerika'da gıdalar için belirlenen maksimum aflatoksin ve diğer bazı mikotoksin seviyeleri Çizelge 1.3. ve ülkemizde gıdalarda bulunan aflatoksin ve diğer bazı mikotoksinlerin maksimum seviyeleri Çizelge 1.4.'te verilmiştir.

Çizelge 1.3. Avrupa ve Amerika’da gıdalar için belirlenmiş en yüksek mikotoksin ve aflatoksin değerleri (Creppy, 2002).

Mikotoksin	Ülke	Maksimum Düzey (µg/kg ya da µ/l, ppb)	Besinler	
AFB₁	Finlandiya	2	Tüm besinler	
	Almanya	2	Tüm besinler	
	Hollanda	5	Tüm besinler	
	Belçika	5	Tüm besinler	
	Portekiz		25	Yer fıstığı
			5	Çocuk gıdaları
			20	Diğerleri
	Avusturya		1	Tüm besinler
			2	Tahıllar, fındık
	İsviçre		1	Tüm besinler
			2	Mısır, tahıllar
	İspanya	5	Tüm besinler	
	Lüksemburg	5	Tüm besinler	
	İrlanda	5	Tüm besinler	
Danimarka	5	Tüm besinler		
Yunanistan	5	Tüm besinler		
Okratoksin A	Fransa	5	Tüm besinler	
	Hollanda	0	Tahıllar	
	Yunanistan	20	Tüm besinler	
	Fransa	5	Tüm besinler	
	Hollanda	0	Tahıllar	
Fumonisin B₁ + B₂	İsviçre	1000	Mısır	
Zearelenon	Romanya	30	Tahıllar, bitkisel yağlar	
	Avusturya	60	Tahıllar	
	Fransa	200	Tahıllar, bitkisel yağlar	
	Rusya	1000	Tahıllar, bitkisel yağlar	
T₂ Toksin	Rusya	100	Tüm besinler	

Çizelge 1.3. Avrupa ve Amerika'da gıdalar için belirlenmiş en yüksek mikotoksin ve aflatoksin değerleri (Creppy, 2002) (devamı)

Mikotoksin	Ülke	Maksimum Düzey (µg/kg ya da µ/l, ppbb (ng/l))	Besinler
Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂	İsveç	5	Tüm besinler
	Norveç	5	Yer fıstığı, Brezilya fıstığı, karabuğday
	Finlandiya	5	Tüm besinler
	Almanya	4	Tüm besinler
		0.05	Enzim ve Enzim formulasyonları
	İngiltere	4	Fındık ve kurutulmuş incir
	Fransa	10	Tüm besinler
	İtalya	50	Yer fıstığı
	Avusturya	5 (B ₂ +G ₁ +G ₂)	Tüm besinler
		0.02 (M ₁ +B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	Çocuk besinleri
İsviçre	5 (B ₂ +G ₁ +G ₂)	Tüm besinler	
	0.01	Bebek besinleri	
Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂	Amerika	20	Tüm besinler
	Belçika	5	Yer fıstığı
	Bosna Hersek	1 (B ₁ +G ₁)	Tahıllar
		5	Fasulyeler
Aflatoksin M₁	İsveç	0.050	Sıvı süt ürünleri
	Avusturya	0.050	Süt
	Almanya	0.050	Süt
	Hollanda	0.050	Süt
		0.020	Tereyağı
		0.200	Peynir
	Rusya	0.5	Süt ve süt ürünleri
	İsviçre	0.020	Bebek besinleri
		0.050	Süt ve süt ürünleri
		0.025	Peynir
	Belçika	0.050	Süt
	Amerika	0.050	Süt
	Çek Cumhuriyeti	0.1	Çocuk sütleri
		0.5	Yetişkin sütleri
	Fransa	0.03	Çocuk sütleri
0.05		Yetişkin sütleri	

Çizelge 1.3. Avrupa ve Amerika’da gıdalar için belirlenmiş en yüksek mikotoksin ve aflatoksin değerleri (Creppy, 2002) (devamı)

Mikotoksin	Ülke	Maksimum Düzey ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ya da μl , ppb)	Mikotoksin
Aflatoksin M1	Bulgaristan	0.5	Süt ve süt ürünleri
Deoksinivalenol	Amerika	1000	Buğday
	Rusya	1000	Tahıllar
	Avusturya	750	Buğday
Okrotoksin A	Romanya	5	Tüm besinler
	Çek Cumhuriyeti	1	Bebek besinleri
		20	Tüm besinler
	Danimarka	5	Tahıllar
		25	Domuzlar
	Avusturya	5	Tahıllar
	İsviçre	2	Tahıllar
Yunanistan	20	Tüm besinler	

Çizelge 1.4. Türkiye’de gıda maddelerindeki en yüksek mikotoksin ve aflatoksin değerleri (Anonim, 2011)

Gıda ⁽¹⁾		Maksimum Limit ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
2.1.	Aflatoksin	B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
2.1.1.	Yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar ⁽²⁾ (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklanma veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) <ul style="list-style-type: none"> Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar hariç 	8,0 ⁽⁶⁾	15,0 ⁽⁶⁾	-
2.1.2.	Badem, antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	12,0 ⁽⁶⁾	15,0 ⁽⁶⁾	-
2.1.3.	Fındık ve Brezilya fındığı (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) <ul style="list-style-type: none"> Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç 	8,0 ⁽⁶⁾	15,0 ⁽⁶⁾	-
2.1.4.	Sert kabuklu meyveler (Bölüm 2.1.2 ve 2.1.3.’de belirtilenler hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0 ⁽⁶⁾	15,0 ⁽⁶⁾	-

Çizelge 1.4. Türkiye’de gıda maddelerindeki en yüksek mikotoksin ve aflatoksin değerleri (Anonim, 2011) (devamı)

Gıda ⁽¹⁾		Maksimum Limit (µg/kg)		
		B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
2.1.	Aflatoksin			
2.1.5.	Yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar (5) ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) <ul style="list-style-type: none"> Rafine edilecek bitkisel ham yağ ve rafine bitkisel yağ hariç 	5,0 ⁽⁶⁾	10,0 ⁽⁶⁾	
2.1.6.	Badem, antepfıstığı ve kayısı çekirdeği ⁽⁷⁾ (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0 ⁽⁶⁾	10,0 ⁽⁶⁾	-
2.1.7.	Fındık ve Brezilya fıncığı ⁽⁷⁾ (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) <ul style="list-style-type: none"> Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç 	5,0 ⁽⁶⁾	10,0 ⁽⁶⁾	-
2.1.8.	Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (Bölüm 2.1.6. ve 2.1.7.’de belirtilenler hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	5,0 ⁽⁶⁾	10,0 ⁽⁶⁾	-
2.1.9.	Kurutulmuş meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	-
2.1.10.	Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri (Bölüm 2.1.11., 2.1.14. ve 2.1.16.’da belirtilenler hariç)	2,0	4,0	-
2.1.11.	Mısır ve pirinç (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	-
2.1.12.	Çiğ süt ⁽⁸⁾ , ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,050
2.1.13.	Baharatın aşağıdaki türleri için; <ul style="list-style-type: none"> Kırmızı biber (<i>Capsicum spp.</i>) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) Karabiber (<i>Piper spp.</i>) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) Zerdaçal (<i>Curcuma longa</i>) Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharatlar 	5,0	10,0	-

Çizelge 1.4. Türkiye’de gıda maddelerindeki en yüksek mikotoksin ve aflatoksin değerleri (Anonim, 2011) (devamı)

Gıda⁽¹⁾		Maksimum Limit (µg/kg)		
2.1.	Aflatoksin (devamı)	B₁	B₁+B₂+G₁+G₂	M₁
2.1.14.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ⁽³⁾ , ⁽⁹⁾	0,10	-	-
2.1.15.	Bebek formülleri ve devam formülleri ⁽⁴⁾ , ⁽¹⁰⁾ (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0,025
2.1.16.	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar ⁽¹¹⁾ , ⁽¹²⁾	0,10	-	0,025
Gıda⁽¹⁾		Maksimum Limit (µg/kg)		
2.2.	Okratoksin A			
2.2.1.	İşlenmemiş tahıllar	5,0		
2.2.2.	İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil) (Bölüm 2.2.9 ve 2.2.10.’da belirtilenler hariç)	3,0		
2.2.3.	Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm)	10,0		
2.2.4.	Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve (Bölüm 2.2.5.’de belirtilenler hariç)	5,0		
2.2.5.	Kahve ekstratı, çözünebilir kahve ekstratı veya çözünebilir kahve	10,0		
2.2.6.	Şarap ve meyve şarapları (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az %15 olan şaraplar hariç)	2,0 ⁽¹³⁾		
2.2.7.	Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli ⁽¹⁴⁾	2,0 ⁽¹³⁾		
2.2.8.	Üzüm suyu, konsantreden üretilen üzüm suyu, üzüm nektarı, üzüm şırası ve konsantreden üretilen üzüm şırası ⁽¹⁵⁾ (doğrudan insan tüketimine sunulan)	2,0 ⁽¹³⁾		
2.2.9.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ⁽³⁾ , ⁽⁹⁾	0,5		
2.2.10.	Bebekler için özel amaçlı diyet gıdalar ⁽¹¹⁾ , ⁽¹²⁾	0,5		

Çizelge 1.4. Türkiye’de gıda maddelerindeki en yüksek mikotoksin ve aflatoksin değerleri (Anonim, 2011) (devamı)

Gıda(1)		Maksimum Limit (µg/kg)
2.2.(devamı)	Okratoksin A	
2.2.11.	Baharatın aşağıdaki türleri için; <ul style="list-style-type: none">• Kırmızı biber (<i>Capsicum spp.</i>) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil)• Karabiber (<i>Piper spp.</i>) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil)• Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>)• Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) Zerdaçal (<i>Curcuma longa</i>) Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharatlar	30,0 (30.06.2012 tarihine kadar) 15,0 (01.07.2012 tarihine kadar)
2.2.12.	Meyan kökü (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , G. İnflate ve diğer türler)	
2.2.12.1.	Meyan kökü (bitkisel infüzyon bileşeni olarak kullanılanlar)	20,0
2.2.12.2.	Meyan kökü ekstratı (16) (özellikle alkolsüz içecek ve şekerleme üretiminde kullanılan)	80,0

1.4. Maya ve Küflerin Özellikleri

Maya ve küf genellikle gıda mikrobiyolojisi çalışmalarında birlikte ele alınır. Maya ve küflerin birlikte ele alınmaların iki nedeni vardır, bunlardan biri her ikisinde mantar aleminin üyeleri olmalarıdır. Ayrıca maya ve küflerin, koloni morfolojileri ile birbirlerinden kolayca ayrılacak şekilde seçici ortamlarda birlikte çoğalabilmeleridir. Tek hücreli ve genellikle miselyum oluşturmeyen yapılar maya, miselyumu oluşturan çok hücreli mantarlara ise küf adı verilmektedir. Eşeyli ve eşeysiz olarak küfler iki spor içerir. Aseksüel sporlar ve ilgili yapılar genel olarak küflerin tanımlanmasında ve ayrıştırılmasında kullanılmaktadır.

Mayalar tek hücrelidir, hücre morfolojisi genellikle yuvarlak, silindirik, oval veya limon şeklindedir. Mayalara ait saf kültürlerde dahi kültür yaşına göre değişmekle birlikte farklı büyüklük ve şekildeki hücrelerle birlikte kendine has hücre morfolojilerine ait üreme koşullarında görülebilmektedir.

Şarap, bira, ekmek vb gıdaların imalatında bazı maya türlerinin ekonomik önemi çok büyüktür. Küflerin bazıları ise peynir yapımında ve yüksek proteinli biyokütle üretiminde dahi kullanılmaktadır. Fakat birçok küf ve maya türünün gıda endüstrisi ve fermantasyonda istenmeyecek derecede kirletici olduğuda bilinen bir gerçektir. Bu ve buna benzeyen küf ve mayalar saprofit oldukları için gıdaların bozulmasına ve üretimde istenmeyecek sonuçlara neden olurlar.

Maya ve küflerin pH aralığı 2 – 9 arasında değişirken, depolama sıcaklığı ise 10 °C ile 35 °C arasında ayrıca su aktivitesi ise 0,85 ve üstü seviyelerde gelişebilir. Bununla birlikte tuz ve şeker konsantrasyonlarının yüksek olduğu alanlarda rahatlıkla büyüyebilirler. Bununla birlikte kompleks karbonhidratlar, pektin ve organik asitler ile protein ve lipitler kullanılabilir.

Bozulmaya neden olan maya ve küfler, gaz yapıcı özellikleri sayesinde gıdalarda acılaşma ve kokuşmaya, bazı farklı gıdalarda ise istenmeyecek düzeyde gözenekli bir yapının oluşması gibi bir takım rahatsızlıklara neden olurlar. Bazı küfler, kontamine ettikleri gıdada gelişerek salgıladıkları mikotoksinler sebebiyle, gıdanın tüketilmesi durumunda meydana gelen zehirlenmelerde ölümlü sonuçlara sebep olabilirler.

Açıkta pazarlanan, üretim teknolojisi nedeniyle ambalajlamadan önce açık havayla temas etmiş, ürünler pastörize bile olsalar ambalaj malzemesinden bulaşan, yıkama

ve soğutma dışında teknolojik olarak işlenmemiş gıdalar için maya ve küf sayısı kalite göstergesi olarak önemli bir rol oynamaktadır. Toprakla temas halinde olan baharatlar gibi yıkanmadan sadece öğütülen ve paketlenen ürünlerde küf sayısı oldukça fazla iken, şekerli ürünlerde ise maya hakimdir. Toplam küf ve maya sayısı için aerobik inkübasyon genellikle 25 °C - 28 °C 'de ve 5 günde yapılır. Genelde küf ve mayaların sayımı aynı besiyerinde yapılmaktadır. Küfe ve mayalar eğer ayrı ayrı sayılmak istenirse aynı besiyerindeki koloni morfolojileri açısından çok kolay bir ayırım yapmak mümkündür.

Küf ve maya sayımı için kullanılan besiyerinde bakteri üremesi besiyerinin asitleştirilmesi veya antibiyotik kullanılmasıyla önlenmektedir. Filtre ile %10 laktik asit sterilize edilerek kullanılabilir. Sterilize edilerek sıvı halde bekletilen ve 45 °C'ye soğutulan besiyerine asit eklenir. Klor tetrasiklin ayrıca bir antibiyotik olarak tavsiye edilir. Küf ve mayalar gıdalardaki renk bozulmasına, tadında acılaşmaya ve kokuya neden olabilir. Bazı durumlarda saklama tekniklerine karşı direnç gösterebilen küfler de (ısıtma, dondurma, antibiyotik ve radyasyon) gıdalarda mikotoksin oluşumuna neden olur. Küf ve maya sayısı; Satışı açık alanlarda yapılan, ambalajlanmadan önce açık hava ile temas etmiş olan hiçbir teknolojik işlem görmeden özellikle sadece öğütülerek paketlenen gıdalar için kalite açısından önemli bir kriterdir.

1.5. Aflatoksinler İçin Kullanılan Analiz Yöntemleri

Aflatoksin analizlerinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Aflatoksin analizlerinde kullanılan yöntemler analiz süresi, güvenilirlik ve maliyet açısından farklılık göstermektedir. Bu farklılıkların ele alınması açısından analiz yöntemleri başlıca; BGYF (Parlak Yeşilimsi-Sarı Floresans) Metodu, Florimetrik Metot, İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC), ELISA (Enzim Bağlantılı İmmüno Sorbent Tahlili) ve RIA (Radyo İmmünoAssay).

Bu yöntemlerden en yaygın kullanılanları HPLC ve TLC'dir. Buna karşılık, TLC maliyet açısından HPLC'den daha uygun bir analiz yöntemi olsa da, TLC güvenilirlik açısından biraz daha az güvenilirdir (2ng/g'nin altında) ve ayrıca ekolojik açıdan zararlı kimyasalların kullanılmasının yanı sıra analiz süreside daha uzundur. Dolayısıyla TLC'yi dezavantajlı hale getirir (Stroka, 2000). Analiz süresinin çok kısa

olmasının yanısıra HPLC pahalı bir yöntemdir. Hata payının çok düşük olmasından ve tespit limitinin TLC'ye göre çok hassas olması sebebiyle daha çok tercih edilir.

ELISA ve RIA önde gelen immünokimyasal tekniklerdir. ELISA, RIA'ya göre basit ve hızlıdır. Antikor moleküllerini bağlamak için çözelti içindeki etiketlenmemiş aflatoksin ve etiketli aflatoksin arasındaki yarışa dayalı sonuçlar verir.

RIA'da etiketleme için radyoaktif izotop kullanılır. Genellikle bu izotop ¹²⁵I'dir. Ancak sonunda açığa çıkan radyoaktif atıklardan dolayı bu yöntem tercih edilen bir yöntem değildir.

1.5.1. BGYF (Parlak Yeşilimsi-Sarı Floresans) Metodu

Ultraviyole ışık altında uzun dalga kojik asitin varlığı tespit edilerek yapılan bu teste BGYF metodu denilir. *A.flavus* ya da *A.parasiticus* metaboliti olarak kojik asit üretilmektedir.

Yeşilimsi sarı renk verenleri belirlemek için BGYF metodunda önce örnek ultraviyole uzun dalga boylu ışık ile incelenir. Sonrasında örnek, ağırlığının 0.6 katı su ile havandan geçirildikten sonra ekstraksiyonu için metanol, asetonitril gibi uygun solventlerle Waring blender yardımıyla 3 dk. karıştırılır. Ölçüm yapılırken, ultraviyole spektrofotometresi ya da spektroflorimetre cihazları tercih edilir.

1.5.2. Florimetrik Metot

Işın enerjisini maddenin çözeltisine göndererek madde uyarıldıktan sonra bu maddenin ilk haline dönmek için aldığı enerji ve verdiği enerji olan davranışları incelenir. Bu maddelere bakıldığında görünür alanlar bazen infrared, gönderilen ışınlar ise ultraviyole görünür. Kısa süre absorbe edilen ışınlar sonrasında floresans ışınları olarak etrafa yayılırlar.

Madde üzerine ışın gönderildiğinde bu floresans ışınları görülür, durduğunda da durur. Dalga boyları 380-720 nm (nanometre) arasında değişmesinin sebebi üzerlerine UV (ultraviyole) ışınları gönderilmesidir. Küçük dalga boyuna sahip ışınlar molekülde bozulmalara bazende parçalanmalara sebep olurlar.

Floresans metodu çok hassas olduğu için çok düşük konantrasyonlarda bile uygulanabilirliği vardır (Gündüz, 2002).

Çift ışın yollu spektrofotometreler güç kaynaklarındaki dalgalanmaları önlemek için kullanılır. Bu cihazların kısımları görünür bölge ve UV cihazlarına benzemektedir. Işın kaynağının güçlü olması için yüksek basınçlı lambalar kullanılır. Spektrofotometrelerde güçlü bir ışın bandı (300-1300 nm) elde etmek için kullanılan floresanlar banttaki dalga boyunu ayırmak için gereklidir. Greyting monokromatörleriyle bu ayırma işlemi yapılabilir. Bu yüzden spektrofotometrelere göre kullanışlı ancak pahalıdır.

Floresans sinyalleri eğer zayıfsa güçlendirmek için spektrofotometrelerde dedektörler ve foto katlandırıcı tüp kullanılır. Ölçümler esnasında silika ya da cam malzemeden üretilmiş kaplar kullanılır.

1.5.3. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Durgun faz boyunca plaka üzerine kaplanmış, numunenin bulunduğu mobil fazın, kapiller olarak hareket ettiği bir metottur. Genellikle ilaçların tanımlanmasında kullanılan bir yöntemdir. TLC, araştırma kolon sıvı kromatografisi ile yapılan ayırma işlemlerine kıyasla daha az maliyetli olmasının yanısıra hızlı ve kolay kullanımından dolayı farklı birçok alanda da kullanılmaktadır. Biyolojik ve biyokimyasal alanlar laboratuvarlar ve ilaç sektöründe de çoğunlukla kullanılmaktadır. Bu sayede TLC en az HPLC kadar analiz yapılmasına olanak bulmuştur.



Şekil 1.1. TLC cihazı

1.5.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Cihaz Özellikleri

Sıvı kromatografi çalışmalarında çapı 1 cm ile 5 cm arasında uzunluğu ise 50 cm ile 500 cm arasında olan cam kolonlar daha çok tercih edilirdi. 150-200 µm aralığında çapı olan partiküller uygun akış hızına ulaşabilmek için katı durgun fazı meydana getirirler. Ancak akış hızı çok düşük olurdu. Bu da süreyi uzatırdı. Vakum uygulamasında hızı arttırmak için iyi sonuçlar vermiştir. (Gündüz, 2002).

Dolgu maddelerini tanecik yapıların azaltılması ve kolonların bunlarla doldurulması ile üzerine yüksek basınç uygulanmasını sağlamıştır. Bu sayede **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi** yöntemi bulunmuştur. Aflatoksin analizi 5 kademedeki gerçekleştirir (AOAC, 2000).

- Ekstraksiyon
- Süzme
- İmunoaffinit Kolon ile Ayırma
- Enjeksiyon
- Ölçüm

Ekstraksiyon:

Fındık ekstraksiyonda 50 gr. örnek alınır ve daha sonra 150 ml teknik metanol, 100 ml distile su ve üzerine 5 g tuz ilave edilerek 3 dk blendırda yüksek hızda karıştırma işlemi yapılır.

Süzme:

Alınan Ekstrakt, filtre kağıdından geçirildikten sonra Whatman No:4'ten süzme işlemi gerçekleştirilir.

İmunoaffinit Kolon (IAC) ile Ayırma:

Antikor içeren kolonlardan, Aflatoksin B₁, Aflatoksin B₂, Aflatoksin G₁ ve Aflatoksin G₂'yi kendisine bağlar. Aflatoksin B₁ için, 100 ng'lık miktara kadar bağlanma olur. Bu kolonların geri kazanımında oran, Aflatoksin B₁, Aflatoksin B₂ ve Aflatoksin G₁ için en az % 80, Aflatoksin G₂ için % 60 olarak bilinmektedir. (AOAC (Resmi analitik kimyacılar derneği), 2000).

İmuno Affinite Kolonu kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi gerekmektedir. Akış hızı 2-3ml/dk (mililitre/dakika) olmak üzere 10 ml PBS (Fosfat tamponu) çözeltisi kolonlardan geçirilir ve IAC'leri hazır hale getirilir. Akış hızı 3ml/dk olmak üzere pipet ile süzütüden alınan 10 ml örnek IAC'den geçirilir. Akış bittiğinde yine aynı hızda 15 ml saf su kolondan geçirilir. Ardından da 3-4 kez şırınga ile hava verilir. 0.5 ml metanol IAC'den geçirildikten sonra bir dakika beklenir ve 0.75 ml metanolden geçirildikten sonra aflatoksinler viale alınmış olur.

Enjeksiyon:

Analiz örneklerinin transferi HPLC'ye oto-örnekleyici veya şırınga yardımıyla yapılır. Vialdeki karışımdan yaklaşık 200 µl (mikrolitre) şırıngayla alınır ve HPLC'ye transfer edilir

Aflatoksin tayini açısından en çok tercih edilen yöntemler arasında en yaygın kullanılan HPLC yöntemidir. Hassas olması, kolay bozulabilen türlere uygulanabilir olması yöntemin yaygın bir şekilde kullanılmasının sebeplerinin başında gelir.

HPLC cihazı:

HPLC sistemi, numuneyi sisteme taşıyan solventi içeren solvent odası ile başlar. Her cihazda 500 ml cam veya paslanmaz çelikten yapılmış en az bir solvent haznesi bulunur. Solvent tankındaki filtreler sisteme zarar veren partikülleri uzaklaştırmak için kullanılır. Solvent sisteme bir pompa ile girer. HPLC'de, pompalama sistemi aşağıdaki gereksinimleri karşılamalıdır: 400 atm'ye kadar basınç üretimi, darbesiz basınç çıkışı, 0,1-10 ml/dk aralığında akış hızları, akış hızı kontrolü ve tekrarlanabilirlik ihtiyacı, korozyona dayanıklı parçalar.



Şekil 1.2. HPLC cihazı

HPLC’ de 3 pompa vardır: Silindir pompalar, sürgülü pompalar, pnömatik pompalar. Diğer bölme örnek enjeksiyon bölmesi olarak adlandırılır. Alınan örneklerin enjeksiyonu, yüksek basınçta yapılır. Örnek enjekte edildiğinde yüksek basınç altında hareketli faz ile karışır ve hareketli fazda çözünerek kolonun tepesine ulaşır. Ulaşmanın hacmi küçüktür. Mobil fazın çoğu baypasta kalırken, numunenin küçük bir kısmı ana mobil faz ile birleşir. Numune daha fazla seyreltmeden kolona ulaşır. Numune seyreltildiğinde, pikler detektörden seyrek çıkar. Enjektörden sonra, analitik sütun ilk numuneyi ayırır. Paslanmaz çelik HPLC kolonu 3-4 mm çapında ve 10-40 cm uzunluğundadır. Günümüzde kullanılan kolonlar 25 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 µm partikül büyüklüğünde, dolgu maddesi ile doldurulmuş kolonlardır (Skoog ve ark., 2002).

Mobil faz, analitik kolonlara girmeden önce genellikle kısa bir kolondan geçirilir. Bu kolonun rolü ayrıca numunede bulunan ve geri dönüşümsüz olarak durağan faza bağlanan bileşikler tutmaktır.

Analitik kolonlarda iki tip paketleme malzemesi vardır. Folyo dolgular ve gözenekli dolgular. Folyo dolgu maddeleri cam veya polimerden yapılır. Yüzeylerinde gözenekli silika, alümina veya iyon değiştirici reçine bulunur. Diğer, gözenekli ve

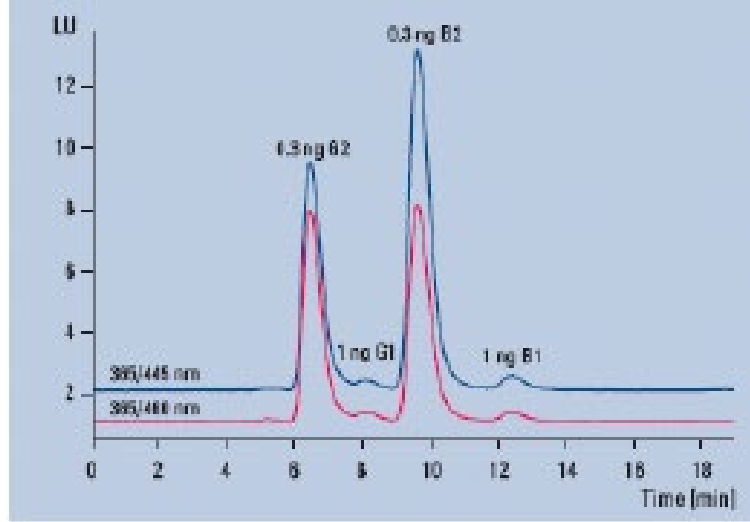
silis, alümina veya iyon değiştirici reğineden yapılmış 3-10 µm'lik parçacıklardan oluşur.

Belirlenecek madde için analitik kolondan ayrılan bileşenler dedektör tarafından tespit edilir. Karşı basınç regülatörü, dedektörün arkasında bulunur. Bu, solvent dedektörden geğerken cihazda hava olmamasını sağlar. Hava kabarcıkları numune bileşenlerinin saptanmasını engeller. Alternatif olarak, çözünmüş gazları çıkarmak için çözücü odasındaki çözücü içinden bir inert gaz geğirilebilir.

- Genel amaçlı dedektörler mobil faz kırılma indeksini, dielektrik sabitini ve yoğunluk dedektörleri
- Kırma İndisi Dedektörü,
- Işın Dağıtma Dedektörü,
- Elektrokimyasal Dedektörler vs.
- Özel dedektörler, bir maddenin UV absorpsiyonunu, floresansını saptar. Difüzyon akımını ölçer.
- IR Absorbans Dedektörleri,
- Floresans Dedektörleri ,
- UV Absorbans Dedektörleri,
- Filtreli UV Absorbans Dedektörleri,
- Monokromatorlu UV Absorbans Dedektörleri

1982 yılında ve sıvı kromatografinin gelişmesinde önemli payı olduğu bilinen 365 makaleden, UV absorpsiyonunun belirlenmesi %71'ini, floresansla %15'ini, kırma indisiyle %5,4'ünü, elektrokimyasal ölçmelerle % 4,3'ünü ve diğer yöntemlerle % 4,3'ünün yapıldığını ortaya koyulmaktadır.

HPLC cihazında floresan dedektörü ile nanogram seviyesinde eşit analiz yapabilir. Bu da bize: Floresans dedektörlerin, çok az bir numune miktarıyla (50 µl gibi), ng düzeyinde aflatoksinleri analiz edilebildiğini gösterir.



Şekil 1.3. Floresan detektörlü bir HPLC cihazında iki ayrı dalga boyu (Schuster et al, 2000)

1.5.5. Immuno Kimyasal Yöntemler

Aflatoksin tayininde kullanılan iki çeşit immunokimyasal yöntem vardır.

- ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
- RIA (Radio Immuno Assay)

ELISA (EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay):

ELISA 1971'de geliştirildi. Test solüsyonundaki etiketlenmemiş aflatoksin ile antikor moleküllerine bağlanma tayini için kullanılan etiketli aflatoksin arasındaki rekabete dayanır. Bu yöntem iki aşamadan oluşur:

- Antikor ve toksin arasındaki reaksiyon
- Enzim bağlı toksin ile birlikte sübstrat reaksiyonu

ELISA yönteminde birinci antikor ilk olarak katı faza adsorbe edilir. Antijeni içeren numune daha sonra ortama eklenir ve antikoru bağlamak için inkübe edilir. İkinci enzime bağlı antikor ortama eklenir ve bağlanması amaçlanır. Karşılık gelen substrat daha sonra enzime eklenir ve enzim aktivitesi ölçülür. ELISA metodunda iki yöntem vardır:

- Yarışmalı metot
- İndirekt metot

Yarışmalı Metot:

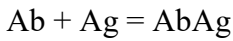
Spesifik antikorlar katı desteğe adsorbe edildikten sonra enzim bağlı antijen ile serbest antijen eklenir ve plaka inkübe edilir. Bağlı ve serbest antijenler katı faza bağlandıktan sonra enzim substratı eklenir ve enzim aktivitesi bakılarak ölçümleri yapılır.

İndirekt Metot:

Spesifik antijen, katı faza bağlanır. Antikorları içeren serum eklenir ve plaka inkübe edilir. Bazı spesifik antikor molekülleri antijene bağlanır. Daha sonra bağlı enzim eklenir ve plaka tekrar inkübe edilir. Enzim ayrıca spesifik antikorlara da bağlanır. Son olarak, substrat ortama eklenir. Uygun koşullar altında, orijinal serumdaki spesifik antikorların miktarı, enzim aktivasyonu ile orantılıdır.

RIA (RadioImmunoAssay):

RIA ilk olarak 1950'li yıllarda insülin çalışmaları için geliştirilmiştir. RIA ölçülmesi kolay olmayan biyolojik maddelerin miktarının belirlenebilmesi amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir. Prosedür esasen bir antikor-antijen kompleksi (AbAg) oluşturmak için bir antikor (Ab) ve bir antijenin (Ag) reaksiyonuna dayanır.



Radyoaktif olarak etiketlenen Antikor ve Antijenler içerisinde en sık kullanılan radyoaktif madde ¹²⁵I dir.

Molekülün yapısal ve kimyasal özelliklerini değiştirmeden proteinlere katılabildiği için tercih edilir. Ayrıca, nispeten uzun yarılanma ömrü (60 gün) ve nispeten zayıf γ -yayıncısı da tercih edilme nedenleridir.

Etiketlenen antijen olduğunda, etiketlenen ve etiketlenmeyen antijenler, bir kompleks oluşturmak için sınırlı miktarda antikorla rekabet eder. İşlem bittikten sonra antijen-antikor kompleksi oluşturmuş olanlar serbest antijenden ayrılır ve iki gruptan birinin radyoaktivitesi ölçülerek antijen miktarı belirlenir. Sonuç önceden oluşturulmuş standart bir harita tarafından belirlenir.

1.6. Kf ve Maya Sayımı – Koloni Sayımı Tekniği – ISO 21527-2 Laboratuvar İnceleme Yöntemleri

Açıkta pazarlanan, üretim nedeniyle ambalajlanmadan önce ürünlerin hava ile temas etmesi, ambalaj malzemesi ile kontamine olduğundan ürün pastörize olsa dahi, yıkama ve yıkama dışında teknolojik bir işleme tabi tutulmayan gıdalar için maya küf sayısı önemli bir kalite göstergesidir. Sadece öğütülen ve yıkanmadan paketlenen baharat gibi toprakla temas eden ürünlerde kontaminasyon yükünden dolayı küf sayısı fazla çıkarken, şeker içeren ürünlerde ise maya sayısı daha fazla çıkmaktadır.

Kf ve maya sayısı genelde gıda mikrobiyolojisi standartlarına göre birlikte değerlendirilir. Genel olarak toplam bakteri sayısındaki gibi, uygun inkübasyon koşulları sağlandığında, uygun bir besiyeri ortamı oluşturulduğunda koloni oluşturan kf ve maya hücrelerinin toplam sayısı elde edilir. Kf ve mayalar için yaygın olarak kullanılan besiyerlerinden herhangi biri ile gerçekleştirilen ekimlerde bu iki grup mikroorganizma uygun şartları bulunduğunda kolaylıkla reyebilirken, bakterilerin üreyerek koloni oluşturmalarını ise ortama asitlik veya antibiyotik kullanımı ile engelleyebiliriz.

1.6.1. Standart Analiz Yöntemi

Genel olarak pratikte toplam kf ve maya sayısı birlikte dikkate alınırken bazı durumlarda ticari olarak değerlendirilmesi gereken ürünleri pazara çıkışlarında ya da son ürüne kadar olan yolcuğundaki kritik kontrol noktalarından herhangi birinde bu iki grubun ayrı ayrı değerlendirilmesi gerekebilir. Ayrı sayım yapılması gereken durumlarda besiyeri seçimi koloni morfolojisine göre yapılmalıdır mesela yapılacak olan çalışmada sadece mayaların üremesi gerekiyor ise kullanılacak olan besiyerine binde 25 oranında sodyum propionat ilave edilerek küflerin koloni oluşturması engellenmiş olur.

Maya ve küflerin toplam sayısı için genellikle 25 °C ile 28 °C ve 5-7 gün aerobik inkübatörler kullanılarak yapılmaktadır. Çok fazla kf miselyum oluşumu nedeniyle sayım esnasında güçlükler oluşabildiği için 3. günden itibaren sayım sonuçları değerlendirilmeye başlanabilir. Eğer genel olarak bu süre sonunda maya ve özellikle kf oluşumu görülmezse 2 gün daha inkübasyona devam edilebilir. Kf kolonileri,

mayalara göre daha geç koloni oluşturabilir, Ancak bu defa da küf kolonileri yayılım göstererek daha önceden oluşmuş maya kolonilerini kapatması gibi durumlarla karşılaşılabilir bu durumlarla karşılaşma ihtimaline yönelik maya kolonilerinin önceden sayılması ya da petri kutusunda işaretlenmesi faydalı olacaktır.

Maya sayımı ve koloni oluşumu için kullanılacak besiyerindeki bakteri üremesi besiyerinin asitleştirilmesi veya antibiyotik kullanılmasıyla önlenir. Filtre ile sterilize edilmiş %10 tartarik asit veya laktik asit kullanılabilir. Sterilize edildikten sonra ve 45°C'ye soğutulan ve sıvı halde bekletilen besiyerlerine asit ilavesi yapılabilir. Eklenenecek olan asit miktarı önceden yapılan testler yardımı ile belirlendikten sonra aynı ortam tekrar kullanılacak ise her zaman aynı miktarda asit miktarda eklenmesi yapılabilir. Asit ilave edildikten sonra dondurulmuş besiyerleri hiçbir şekilde çözdürülmemelidir. Klortetrasiklin hidroklorürün antibiyotik olarak kullanılması tavsiye edilir. Bu antibiyotik %1 konsantrasyonda hazırlanıp filtre ile sterilizasyon yapılır. Işık görmeyecek şekilde ve +4 °C' de en fazla 1 ay saklanabilir. Antibiyotik, 45 °C'de sterilize edilen ve sıvı halde tutulan besiyerine 40 ppm nihai konsantrasyonda eklenir. Maya ve küf sayımında kullanılacak bütün besiyerlerine antibiyotik veya asit eklenmesi gerektiği gibi bir şart yoktur. Bazen besiyerleri zaten antibiyotik içerir ve/veya kendisi zaten yeterince asidik olabilir.

Küf ve Mayaların gıdalarda sayımı için Oksitetrasiklin Glikoz Maya Agar (Merck 1.10877) Patates Dekstroz Agar (Merck 1.10130), Malt Ekstrakt Agar (Merck 1.05398), Wort Agar (Merck 1.05448), Rose Bengal Kloramfenikol Agar (Merck 1.00467), Dikloran Rose Bengal Kloramfenikol Agar (DRBC) (Merck 1.00466), süt ve ürünlerinin analizi için Maya özü Glukoz Kloramfenikol Agar (Merck 1.16000), düşük su aktiviteli gıdalardaki kseroofil küflerin sayımı için Dikloran Gliserol Agar (DG 18) (Merck 1.00465) en yaygın kullanılan besiyerleridir.

Maya ve küflerde sayım işlemi iki şekilde yapılır; Dökme kültürel sayım yöntemi ve standart yayma ile yapılır. Eğer dökme yöntemi ile çalışılıyorsa termal şoklardan korunmak için besiyeri sıcaklığının 45 °C'yi geçmemesine dikkat etmek gereklidir. Besiyerinde küf ve mayanın hızlı büyümesi, tek düze ve standart koloni oluşumu, sayım sonrası gereken izolasyon ve tanımlamanın kolay olması nedeniyle ise sürüntü kültürü sayım yönteminin kullanılması daha avantajlı olacaktır belirtilmektedir. Maya sayımında kullanılan EMS (En muhtemel sayı) yöntemi, küflerin sayımında

kullanılmamaktadır. Ozmofilik maya sayımı bölümünde EMS yönteminden bahsedilecektir.

1.6.2. Özel Grupların Sayımı

Meyve suyu konsantrelerinde ve özellikle elma suyunda olmak üzere ozmofilik maya sayımı kullanılmakta ve bu anlamda en önemli kalite kriteri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ürünlerin bozulmasına sebep olan bu gruptaki mayalar özellikle meyve suyu konsantrelerinde daha çok karşımıza çıkmaktadır. EMS yöntemi ile sayım %50 Glikoz Broth besiyeri kullanılarak Ozmofilik – ozmotolerant mayaların beraberce sayımında kullanılmaktadır. Ayrıca Uluslararası Meyve Suyu Federasyonu (IFU) bu iki grubun ayrı ayrı sayılmasını önermektedir.

Küflü dane sayımı çoğunlukla buğday ve diğer tahıllar, fındık vb. ürünlerde başvurulan en önemli kalite göstergelerindedir. Analizi yapılacak küf gelişimi için hazırlanmış uygun besiyerine yeteri kadar analiz örneği dane önceden hazırlanmış ve katılmış besiyerine dökülür. Danelerin tamamının besiyerine yerleştirilmesine dikkat edilmelidir. Yüzde küflü dane sayısı hesaplaması ise petri kutusunda küf gelişimi olanların sayısının toplam dane sayısına bölünmesi ile hesaplanabilmektedir. Küf kolonilerinin birbirine karışma ihtimaline karşılık inkübasyonun üçüncü gününde steromikroskop ile petri kutusu inceleyerek, mikrokoloni oluşturan danelerin sayılması faydalı olacaktır.

Daha çok salça ve ketçap gibi domates ürünlerinde mikrobiyolojik kalitenin belirlenmesi amacıyla Howard Lamı saha sayımı kullanılarak hammaddenin kalitesi hakkında bilgi sağlanmaktadır. Meyve sularında da bu yöntem kullanılmaktadır.

Maya sayısının hızlı bir şekilde belirlenebildiği mikroskopik bir sayım yöntemlerinden biri olan, Thoma lamı (bira, şarap, vs.). fermantasyon amacı ile mayaların kullanıldığı üretimlerde tercih edilmektedir. Farklı olarak canlı hücre sayısı belirlenebilmesi diğer mikroskopik sayım yöntemleriyle arasındaki farkı ortaya koymaktadır.

1.7. Kullanılan Besiyerleri

1.7.1. Maya özü Glukoz Kloramfenikol Agar (Merck 1.16000)

Dehidre edilen besiyerleri distile suda 40 g/l'ye ısıtılmak sureti ile eritilir, otoklavda ise 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra bu besiyeri 12,5 ml'lik steril petri kaplarına dökülür. Hazırlanan besiyerleri artık berrak sarı renkli olup buzdolabında 4 ay aynı zamanda oda sıcaklığında 2 hafta süreyle saklanabilir. Refakatçi floranın gelişimini baskılamak için besiyerlerinin bileşimlerinde kloramfenikol kullanılır. Küf ve maya besiyerlerine göre en büyük hazırlama kolaylığı ise içerisinde antibiyotiğin bulunması ve otoklavdan sonra farklı bir katkıya gerek duyulmamasıdır. 1 kutu 500 g besiyeri ile 1000 petri hazırlanabilir.

1.7.2. Malt Ekstrakt Agar (Merck 1.05398)

Dehidre hale getirilmiş besiyerleri distile suda 48 g/l'ye ısıtılmak sureti ile eritilmektedir, otoklavda ise 121 °C'de 10 dakika sterilize edildikten sonra ve 12,5 ml'lik steril petri kaplarına dökülür. Hazırlanan besiyerleri artık berrak sarımsı renkte olup buzdolabında 2 ay süreyle saklanabilir. En çok dikkat edilmesi gereken nokta ise otoklavda sterilizasyon esnasında aşırı ısınmadan kaçınmak olmalıdır. 1 kutu 500 g besiyeri ile 833 petri hazırlanabilir.

1.7.3. Patates Dekstroza Agar (Merck 1.10130)

Dehidre edilen besiyerleri distile suda 39 g/l'ye ısıtılmak suretiyle eritilir, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu yapıldıktan sonra ve 12,5 ml'lik steril haldeki petri kaplarına dökülür. Hazırlanan besiyerleri artık berrak açık sarı renkte olup buzdolabında 2 ay süreyle saklanabilmektedir. Asitleştirme isteniyorsa (pH 3,5), su banyosu içerisinde bekletilen ortamın 45°C - 50°C sıcaklığa düştüğünde filtrelerle sterilize halde 14 ml %10'luk tartarik asit eklenir, karıştırılır ve 12,5 ml olacak şekilde steril petri kaplarına dökülür. Asitlenmiş ortam yeniden eritilemez. Analiz edilecek numunede eşlik eden flora olarak bakteri yükü yüksek ve/veya önemsiz değilse, Patates Dekstroza Agar besiyeri asitleştirmeden kullanılabilir. 1 kutu 500 g besiyeri ile 1040 petri hazırlanabilir.

1.7.4. %50 Glikoz Suyu

Ozmofilik/ozmotolerant maya sayımı için meyve suyu konsantrelerinde kullanılabilecek besiyerinin hazır ticari preparatı bulunmamaktadır. Laboratuvarında hazırlayabilmek için; 1 litreye işaretlenmiş erlen içine 500 g glikoz (Merck 1.08342), binde 5 olacak şekilde 5 g maya ekstraktı (Yeast Extract ; Merck 1.03753) ardından işaretlenmiş olan yere kadar distile su ilavesi ile hazırlanır. Isıtılıp ve karıştırılmak sureti ile eritilir. Her tüpe 10'ar ml dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu sağlanır. Hazırlanan besiyerleri artık berrak ve kahverengi renktedir. Buzdolabında 2 ay süreyle saklanabilmektedir. Artık ozmofilik/ozmotolerant mayalar dışında herhangi bir refakatçi flora yüksek glikoz konsantrasyonu sebebi ile gelişemez. Standart EMS yöntemi ile ekim yapılmadan önce %20'lik glikoz kullanılarak yapılan seyreltmeden sonra ozmotik şoktan sakınmak için tüplerin üzerine 2 cm olacak şekilde (4 ml yaklaşık) katı parafin (steril) (Merck 1.07158) ile kapatılır ve 30 °C' de 10 gün süreyle inkübatörde tutulur. 10 gün sonunda eğer gaz oluşumu varsa ve parafin yukarı itilmişse bu durum pozitif olarak değerlendirilir. Gaz oluşumuna bağlı olarak parafin tabakasının yukarı itilmesi pozitif olarak değerlendirilir. Ekim işlemi tamamlanmış tüplerde katı parafin dahil etmek zor bir uygulama olacağından,. Kullanılmak istenilen pipetin daha önce bunzen bekinde ısıtılmak suretiyle ile katı parafinin pipet içinde donmasına engel olunulabilir.

1.7.5. Oksitetrasiklin Glikoz Maya Agar (Merck 1.10877)

Gıda maddeleri başta olmak üzere hemen her türlü materyal için küf ve maya belirlenmesi ve sayımında kullanılan bir besi yeridir.

Dehidre hale getirilen besiyerleri 30 g/l konsantrasyondaki distile suda ısıtılmak sureti ile eritilerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu yapılır. Otoklavlama işleminden sonra 50 °C'ye soğutulmuş besiyerine 2 şişe/l Oksitetrasiklin Glikoz Maya'nın selektif olarak hazırlanmış katkı maddesi (Merck 1.09877) veya 1 ml/l gentamisin solüsyonu (Merck 1.11977) eklenerek, karıştırmak sureti ile petri kaplarına dökülerek hazırlanır. Oksitetrasiklin bileşiminde olan Oksitetrasiklin Glikoz Maya katkı maddeleri, özellikle tereyağlarında yapılan rutin analizler için önerilmektedir. Oksitetrasiklin yerine Enterobakteriya familyası üyelerinin daha iyi baskılanması için dışkı analizlerinde gentamisin kullanılmalıdır. 1333 petri kutusu, 500 gr dehidre besiyerinden ve 12.5 ml/petri olacak şekilde hazırlanır. 500 gr dehidre

besiyeri içeren bir kutu için 33 şişe Oksitetrasiklin Glikoz Maya katkı maddesine ihtiyaç duyulmaktadır. 15 şişe/kutu olarak bu katkı maddesini piyasada bulmak mümkündür. 500 ml dehidre bir besiyeri için 17 ml gentamisin çözeltisine ihtiyaç duyulmaktadır. Gentamisin çözeltisinin her şişesinde 10 ml bulunmaktadır.

1.7.6. Wort Agar (Merck 1.05448)

Mayalar için özel olarak hazırlanmış bir besiyeridir. Dehidre hale getirilen besiyerleri 55 g/l konsantrasyondaki distile suda ısıtılmak sureti ile eritilir ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyon yapılır. Bakteri üremesini önlemek için pH 3,5'a düşürülecekse 50°C'ye soğutulmuş ve filtrelerle steril hale getirilmiş %10'luk laktik asit çözeltisinden 12 ml/l eklenir, karıştırılmak sureti ile petri kutularına aktarılır. 1 kutu 500 g'lık dehidre hale getirilmiş besiyeri ile 727 petri kutusu hazırlanabilir. Laktik asit (Merck 1.00366) % 90 konsantre olduğundan ve 500 ml içerdiğinden 41 kutu dehidre besiyeri için 1 şişe laktik asit 500 g yeterlidir.

1.7.7. Rose Bengal Kloramfenikol Agar (Merck 1.00467)

Küf ve maya sayımı için hazırlanmış bu besiyeri özel olarak proteinli gıdalar için kullanılmaktadır. Dehidre besiyeri 32,2 g/litre distile su içerisinde kaynatılarak eritmek sureti ile ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyon yapılır. Hazırlanan besiyeri artık pembe-kırmızı renktedir. Işık görmeyecek şekilde ve buzdolabında olmak kaydıyla 1 hafta saklanabilir. Ortamın pH'ı nötr olmasına rağmen, bakteri gelişimi kloramfenikol tarafından baskılanır. Rose Bengal, küfün yayılan bir koloni oluşturmasını önleyerek sayımı kolaylaştırır. 1 kutu dehidre hale getirilmiş besiyerinde 12.5 mL'lik petrilere 1242 adet hazırlanır.

1.7.8. Dikloran Rose Bengal Kloramfenikol Agar (Merck 1.00466)

Yiyecekleri bozan maya ve küfleri saymakta kullanılır. Dehidre hale getirilen besiyerleri 31,6 g/litre distile suda kaynatılarak eritmek sureti ile otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyon yapılır. Hazırlanan besiyerleri artık berrak ve pembe renklidir. Işık görmeyecek şekilde ve buzdolabında olmak kaydıyla 1 hafta saklanabilir. Dikloran kolonilerin yayılımını durdurarak sayımı kolaylaştırır. 1 kutu 500 gr. dehidre besiyeri ile 12,5 ml'lik petri hesabıyla 1265 petri kabı hazırlanır.

1.7.9. Dikloran Gliserol Agar (DG18) (Merck 1.00465)

Su aktivitesi düşük kuru ve yarı kuru gıda maddelerinde kseroofilik ve kserotolerant küflerin tespiti ve sayımı için kullanılan bir besiyeridir. Dehidre hale getirilen besiyeri 31,6 g/l'lik konsantrasyona sahip distile suda kaynatılmak sureti ile eritilir, 175 ml/l'lik gliserol (Merck 1.04092) eklenir ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilizasyon yapılır. Hazırlanan besiyerleri artık kehribar renginde ve hafif opaktır. Işık görmeyecek şekilde ve buzdolabında olmak kaydıyla 7 gün süreyle saklanabilir. Ortama %18 gliserol ilave edilirse eğer su aktivitesini 0,99'dan 0,95'e düşürülmüş olur. Su aktivitesinin düşük olması ve kloramfenikol bakteri üremesini engellemektedir. Dikloran kolonilerin yayılımını durdurarak sayımı kolaylaştırır. 1 kutu 500 gr. dehidre edilmiş besiyeri ile 12,5 ml'lik petri hesabıyla 1265 petri hazırlanabilmektedir.

Kaynak: <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/942121011.pdf>

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Numune Alınması

Sakarya Ticaret Borsası üyeleri çiftçiler tarafından ihracatta gerekli kontrollerin yapılabilmesi için paketler halinde natürel çiğ fındık örneklerinden seçilerek toplamda 102 ayrı numune küf, maya ve aflatoksin yönünden test edilmiştir. Laboratuvar çalışmaları Aflatoksin G2, G1, B2, B1 ve toplam aflatoksin ve maya, küf kolonilerinin sayımı açısından 20.07.2020 tarihinde başlayıp 11.09.2020 tarihinde Sakarya Bölgesinden Sakarya Ticaret Borsası'na bağlı ATB Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı'na gelen numunelerden rastgele olarak örneklem grubu oluşturulmuştur.

2.2. Numune Hazırlanması

2.2.1. Küf ve Maya Sayımı – Koloni Sayımı Tekniği – ISO 21527-2

Uygun olan numunenin ilk olarak fiziksel özellikleri not edildi. Numuneler analize hazırlanırken fiziksel özellikleri göz önünde bulunduruldu ve ISO 21527-2:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal Method For The enumeration of enumeration of yeast and moulds- Part 2: Colony-count technique in product with water activity greater than 0,95 'e göre belirtilen hususlara uygun olarak numune analize hazırlandı.

Analiz numunesi aseptik şartlarda 9X ml Peptone Water/MRD içerisine tartıldı. Uygun şekilde numunenin cinsine bağlı olarak homojenize edildi (Stomacher cihazı, blender vs. yardımı ile).

Kullanılan ekipmanlar:

- İnkübatör (25±1 °C)
- Su Banyosu (45-50°C)
- Numune Hazırlayıcı (Stomacher)
- Tüp Karıştırıcı (Vortex)
- Koloni Sayacı
- Manyetik Isıtıcı

- Güvenlik Kabini
- Genel Laboratuvar Malzemeleri

Kullanılan Besiyeri:

ISO 21527-2'ye göre önerilen şekilde ekim için Dichloran %18 (mass concentration) glyserol agar (DG 18) besiyeri kullanıldı. Toz olarak temin edilen besiyeri içeriği ambalajı üzerinde belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlandı. Hazırlandıktan sonra otoklavda 121 °C sıcaklık ve 1 atm basınçta 15 dakika steril edildi. Sterilizasyon sonucunda besiyeri 45-50°C' de su banyosunda soğutulurak steril petrilere döküldü.

Ekim:

- Hazırlanan 10^{-1} 'lik numunedan 0,1 ml alınarak içerisinde DG 18 besiyeri bulunan petrilere aktarıldı.
- Ayrıca gerekli görülen seviyelerde seri dilüsyonlar hazırlanarak DG 18 besiyerine ekim işleminin gerçekleştirilmesi sağlandı.
- Petrilere aktarılan numuneler drigalski spatülü (yayma çubuğu) yardımıyla yaydırıldı. Petri plakaları ters çevrilmeden 25 ± 1 °C sıcaklıktaki inkübatörde 7 gün inkübe edildi

Sayım:

- İnkübasyon işleminden sonra petri plakalarında gözlemlenen pembe renkli yuvarlak küçük koloniler maya kolonileri olarak değerlendirilirken ipliksi görünümlü merkezi olan koloniler küf olarak değerlendirildi.
- Şüpheli koloni içeren tüm petrilere sayım yapıldı. Sayım yapılırken 150 koloniden az koloni içeren petrilere tercih edildi.
- Sayımlar kob/g veya kob/ml olarak rapor edildi.

Hesaplama:

- DRBC/DG 18 besiyerlerindeki şüpheli koloniler sayıldı ve aşağıdaki formül yardımıyla toplam koloni sayısı hesaplandı (ISO 7218)

$$N = \Sigma C / V_x [(n_1) + (0,1x n_2)] \times d$$

Burada; N: Toplam koloni sayısı (kob/gr veya kob/ml)

C: Tüm petrillerdeki koloni sayıları toplamı.

V: Hacim (ml)

n_1 : 1. dilusyondaki petri sayısı.

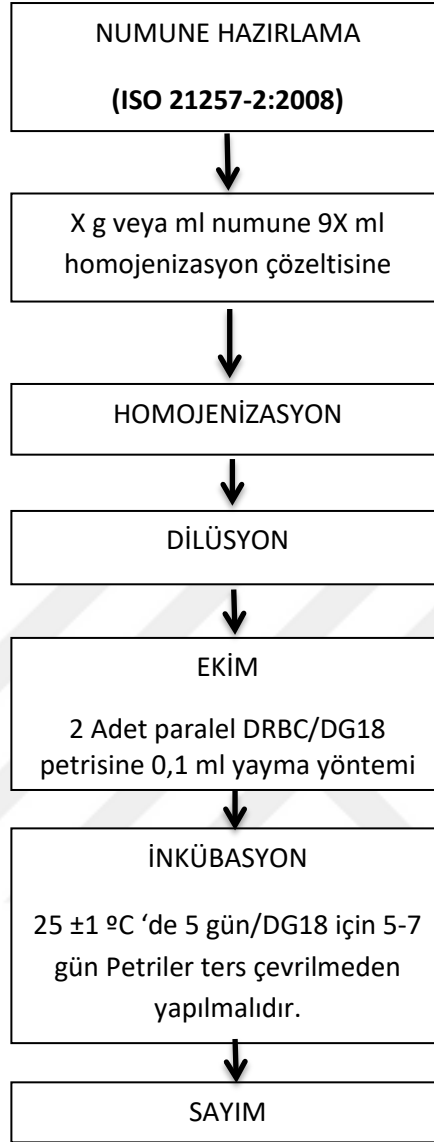
n_2 : 2. dilusyondaki petri sayısı.

d : İlk dilüsyonun seyreltme faktörü

Eğer sayım yapılan petride (yani ilk dilüsyonda, sıvı numunede ya da başlangıç dilüsyonunda) 10 koloniden az koloni varsa toplam koloni sayısı aşağıda gösterildiği gibi hesaplanır.

$$N = \Sigma C / V_x d$$

Eğer ekim yapılan her petride 300 koloniden fazla koloni üremiş ise toplam koloni sayısı aşağıda gösterildiği gibi hesaplanır. $> 300/V_x d$ şeklinde hesaplanarak bulunan değer “>” ibaresi ile raporlandı.



Şekil 2.1. Bütün Gıdalarda Küf Maya Sayımı Akış Şeması

ISO 21527-1:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds-Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95

ISO 21257-2:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal Method For The enumeration of enumeration of yeast and moulds- Part 2: Colony-count technique in product with water activitiy greater than 0,95

2.2.1.1. Mikroskopik İnceleme

Laktofenol pamuk mavisi boyama yöntemi: (laktik asit, kristal fenol, gliserol, distile su, pamuk mavisi): Laktofenol özellikle küflerin hif ve sporlarını incelemek için tercih edildiğinden, çalışmamda boyama preparatlarında laktofenol mavisi kullandım. Numuneleri incelemeye hazırlamak için temiz bir lam üzerine bir damla laktofenol pamuk mavisi solüsyonu yerleştirdi. Selofan bandın yapışkan tarafı Petri kabında oluşan mantar kolonisi ile temas ettirildikten sonra lam üzerindeki laktofenol pamuk mavisi üzerine sıkılarak yapışkan kısmın lam yüzeyine yapışması sağlandı. Daha sonra mikroskop altında incelendi.

2.2.1.2. Tür Tayini

Mikroskopik inceleme Olympus CX21 marka ışık mikroskobu ile yapıldı. 4X, 10X, 40X ve 100X lük objektiflerde görüntüler alınarak cep telefonu objektifi ile fotoğraflandı. Alınan kayıtlar “ Atlas of Fungal Infections, Ed: C. Kauffmann, 2 nd edt, Springer” kitabı içinde yer alan tanımlanmış Aspergillus örneklerine ait mikroskopi resimleri üzerinden karşılaştırılarak, tür tespiti yapıldı.

2.2.2. HPLC Yöntemi ile Aflatoksin Tayini

Numune kabulü, hazırlanması ve saklanması (Rhone Diagnostic Aflaprep IFU- Ref No: A29-P07.V1-Aplikasyon Metodundan modifiye edilmiştir.) ve (AOAC 2005.08)'ne göre kabul edilen analiz numunesinin uygunluğu Bölüm Sorumlusu tarafından kontrol edildi ve ilgili prodesürde tanımlandığı gibi öğütme işlemine tabi tutularak homojen bir şekilde öğütülmesi sağlandı.

Ön Hazırlık İşlemleri:

- Numune kabulü, hazırlanması ve saklanması (Rhone Diagnostic Aflaprep IFU- Ref No: A29-P07.V1-Aplikasyon Metodundan modifiye edilmiştir.) ve (AOAC 2005.08)'ne göre hazırlanmış homojen numuneden 50±0,5 gr tartıldı. Tek parti gelen resmi analizler ve özel istek analizleri iki paralel olarak çalışıldı.

Ekstraksiyon:

- Tartılan numuneye 150 ml analitik metanol, 100 ml distile su, 5 g NaCl ilave edilerek 3 dakika blendırda (300 devir/dk) karıştırıldı.

Dilasyon (Süzüntü alma):

- Ekstrakt iki kat filtre kağıdından süzülür.
- Ekstarakt filtratından 5 ml pipetle alınır.
- 10 ml saf su ile seyreltilir.
- Adsorbsiyon
- Aflaprep immunoaffinity kolonlar buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlanır.
- İmmunoaffinity kolonların ağzı açılıp içerisindeki sıvının 4-5 damla akması sağlanır.
- Plastik Şırıngalar kolona takıldıktan sonra 15 ml' lik numune filtratı akış hızı 3ml/dak. (saniyede 1 damla) olacak şekilde kolondan geçirilir.
- Akış hızı maksimum 5ml/dak. olacak şekilde 20 ml distile su geçirilerek kolon yıkanır. 3-5 kez hava geçirilir
- Elusyon (Clean Up)
- Viale almak için önce immunoaffinity kolona 1 ml HPLC grade metanol eklenir ve kendiliğinden vial içine akması beklenir.
- Metanol geçişi tamamlandıktan sonra 1 ml HPLC su kolondan geçirilerek miktar 2 ml'ye tamamlanır.
- Viale alınan elüsyonun bulanık olması durumunda şırınga ucu filtre yardımıyla süzme işlemi gerçekleştirilir.
- HPLC'ye enjeksiyon yapılır.

Toksin miktarı limitleri “Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği”ne göre fındık, mısır ve yerfıstığında Aflatoksin B1 için 5 µg/kg, Toplam Aflatoksin için ise 10 µg/kg'dır (Kaynak:Anon., 2008).

HPLC' ye enjeksiyon:

- Otomatik enjeksiyonda enjeksiyon hacmi kadar solvent kendiliğinden otomatik enjektör tarafından alınmaktadır. Enjeksiyon hacmi elimizdeki standart loop için maksimum 100µl dir.
- Hazırlanan numune solventi cihaza enjekte edilmeden önce 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmış standart solventleri cihaza verilir ve cihazın kalibrasyon doğrulaması yapılır.(bu işlem günlük olarak tekrarlanır.)
- Günlük doğrulama işleminin ardından hazırlanan numune solventinin enjeksiyonu gerçekleştirilir.
- 10 numunede bir standart solventi verilerek kalibrasyon eğrisi kontrol edilir.

Hesaplamalar:

Yağlı Kuru Meyveler, Yağlı Tohumlar Ve Bunlardan Yapılan Ürünler, Mısır ve kurutulmuş meyveler için sonuçların hesaplanmasında kullanılacak dilüsyon katsayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\text{Çarpım Faktörü} = \frac{\text{solvent(ml)} * \text{elüsyon(ml)}}{\text{Wt (g)} * \text{filtrat (ml)}}$$

$$\text{Wt (g)} * \text{filtrat (ml)}$$

$$\text{Wt} = \text{numune ağırlığı (50g)}$$

$$\text{Filtrat hacmi} = \text{kolondan geçen filtratın hacmi(5ml)}$$

$$\text{Solvent hacmi} = \text{ekstraksiyonda kullanılan solvent hacmi(250 ml)}$$

$$\text{Elüsyon hacmi} = \text{elüsyondan sonraki son hacim (2 ml)}$$

2.3. İstatiksel İnceleme

İstatistiksel analiz SPSS sürüm 25.0 yazılımı (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı veriler şu şekilde ifade edildi: ortalama±standart sapma (SD), medyan (min-maks) veya sayı ve sıklık. Değişkenlerin normallik dağılımını değerlendirmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerin ortalamalarının karşılaştırılması için bağımsız örneklem t-testi kullanıldı. Türler arasında koloni sayısı ortalaması açısından farklılık olup olmadığı One-Way- ANOVA testi ile değerlendirildi. Kategorik değişkenler ki-kare testi ile değerlendirildi. Her iki analizde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

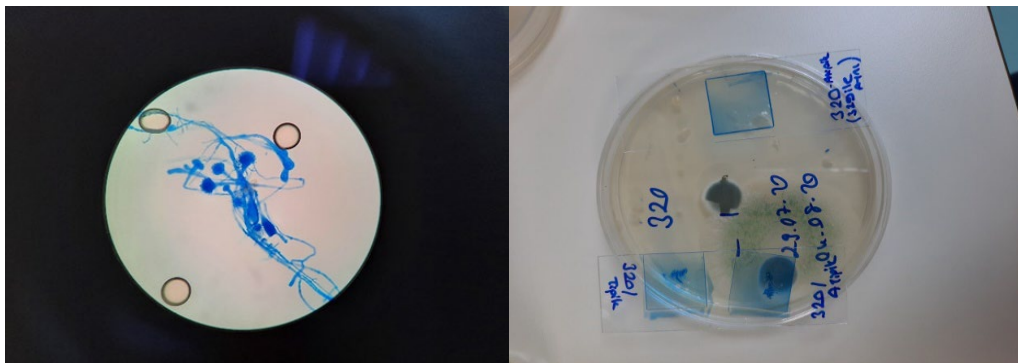
3. BULGULAR

3.1. Küf ve Maya Sayımı – Koloni Sayımı Tekniği – ISO 21527-2 İnceleme Sonuçları

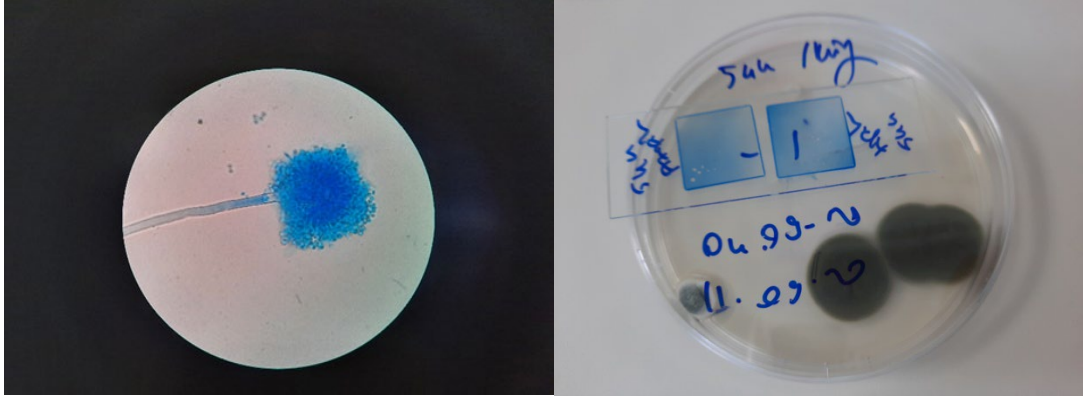
Besiyeri ekim sonuçlarına bakıldığında ise 102 örneğin 74'ünde (%72,54) üreme tespit edilmiştir. Üreme saptanan 72 petri kabının mikroskobik inceleme sonuçlarına bakıldığında 40 tanesinde (%54,05) *Penicillium* spp., 11 tanesinde (%14,86) *Aspergillus fumigatus*, 9 tanesinde (%13,51) *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, 7 tanesinde (%9,45) *Aspergillus* spp. ve 5 tanesinde (%8,01) maya üremesi olduğu saptanmıştır. (Çizelge 3.1)



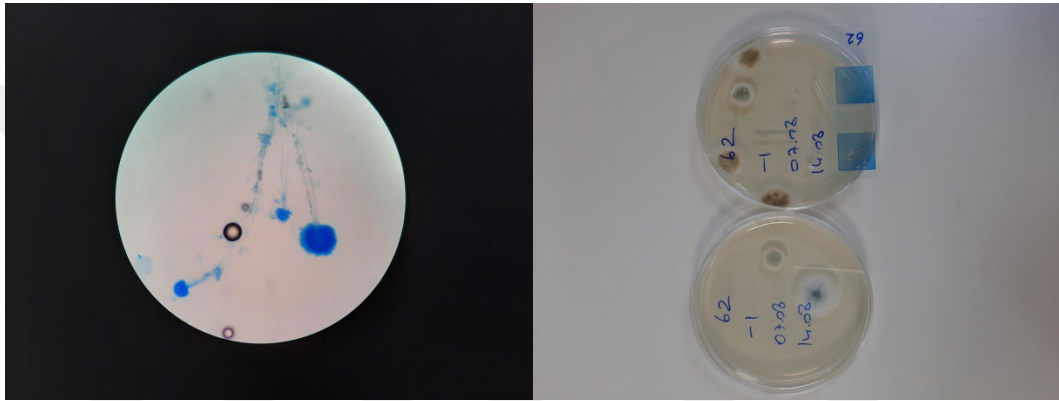
Şekil 3.1. *Penicillium* spp. boyamada laktofenol mavisi kullanılmış ve görüntüler 100X lens ile çekilmiş, görüntüleme için cep telefonu kullanılmıştır, makroskobik görüntü.



Şekil 3.2. *Aspergillus fumigatus*, boyamada laktofenol mavisi kullanılmış ve görüntüler 100X lens ile çekilmiş, görüntüleme için cep telefonu kullanılmıştır, makroskobik görüntü



Şekil 3.3. *Aspergillus niger*, boyamada laktofenol mavisi kullanılmış ve görüntüler 100X lens ile çekilmiş, görüntüleme cep telefonu kullanılmıştır, makroskobik görüntü



Şekil 3.4. *Aspergillus flavus*, boyamada laktofenol mavisi kullanılmış ve görüntüler 100X lens ile çekilmiş, görüntüleme cep telefonu kullanılmıştır, makroskobik görüntü

Maya kolonisi üremesi saptanan ancak kesin tür tayini yapılamayan 5 (%8,01) örnekte ayrı bir grup olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.1. Besiyeri tekniğine göre saptanan türlerin üreme gerçekleşen besiyeri toplam sayısı üzerinden sayı ve yüzde dağılım oranları

SAPTANAN TÜR	SAYI (%)
<i>Penicillium</i> spp.	40 (%54,05)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11 (%14,86)
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i>	9 (%13,51)
<i>Aspergillus</i> spp.	7 (%9,45)
Maya	5 (%8,01)

3.2. HPLC Yönteminin Sonuçları

102 örnekte Türk Gıda Kodeksi kritik değer eşliğinin (Anonim, 2011) üzerinde bir bulgu saptanamadı. Bu üreme saptanmayan örneklerin 72'sinde ise Küf ve Maya Sayımı – Koloni Sayımı Tekniği – ISO 21527-2 tekniği ile yukarıda belirtilen türde maya ve küf örnekleri saptanmıştır. Örneklem grubunda yer alan toplam 102 adet numunenin analiz sonuçlarına göre HPLC analiz yöntemi ile numunelerin hiçbirinde toksin miktarı limitlerin üzerinde bulunmamıştır.

3.3. İstatiksel Değerlendirme Sonuçları

İstatiksel değerlendirme sonuçlarına göre tür dağılımı açısından “*Penicillium spp.*” üremesi istatistiksel olarak diğer gruplara oranla anlamlı düzeyde yüksekti. ($p<0.05$) (Çizelge 3.2.)

Çizelge 3.2. İstatiksel değerlendirme özet

Tür Adı	Sayı	Yüzde(%)	p
,00 tür tayini yok	15	14,7	
1,00 <i>Penicillium spp.</i>	40	39,2	<0.005
2,00 <i>A. fumigatus</i>	11	10,8	
3,00 <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i>	9	8,8	
4,00 <i>Aspergillus spp.</i>	7	6,9	
5,00 maya	5	4,9	
6,00 üreme olmayanlar	15	14,7	
Total	102	100,0	

Türler arasında koloni sayısı ortalama değerleri Çizelge 3.3.'te paylaşılmıştır. One-way –ANOVA analizine göre koloni değerleri ortalaması *Aspergillus flavus-niger* türünde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.05$). (Çizelge 3.3.)

Çizelge 3.3. Türlerin koloni sayılarına göre ortalama değerleri

Tür Adı	N(Sayı)	Koloni değeri (Mean)	Std. Deviation	Minimum	Maximum
,00 tür tayini yok	15	411,33	226,932	100	900
1,00 <i>Penicillium spp.</i>	40	1631,25	2323,257	200	11000
2,00 <i>A. fumigatus</i>	11	1441,82	1642,935	500	6100
3,00 <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i>	9	3294,44	4196,907	500	11000
4,00 <i>Aspergillus spp.</i>	7	1407,14	1416,106	700	4600
5,00 maya	5	864,00	312,218	600	1400
6,00 üreme olmayanlar	15	,00	,000	0	0
Total	102	1285,29	2157,571	0	11000

Çizelge 3.4. İstatiksel analiz değerleri

Toplam koloni sayısı

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	78615281,627	6	13102546,938	3,179	,007
Within Groups	391551059,549	95	4121590,101		
Total	470166341,176	101			

Koloni sayılarına ve dağılımlarına ait karşılaştırma verileri ise Çizelge 3.5. te gösterilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde kuruyemişlerde koloni sayılarına ait standart değerler minimum 10^3 - maksimum 10^4 olarak belirlenmiştir. Çizelge 3.5.'te belirtildiği gibi sadece 3 adet petride yapılan sayımlarda koloni sayısı 10^4 olarak tespit edilmiş olup, istatistiki açıdan önemli bulunamadı.

Çizelge 3.5. Ki kare testi ile türlere göre koloni sayılarının dağılımı

Total Koloni Sayısı	Mantar Türü						
	,00 tür tayini yok	1,00 <i>Penicillium</i> spp.	2,00 <i>A. fumigatus</i>	3,00 <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i>	4,00 <i>Aspergillus</i> spp.	5,00 maya	6,00 üreme olmayanlar
100	1	0	0	0	0	0	0
1000	0	2	0	0	1	0	0
10000	0	0	0	1	0	0	0
1100	0	1	0	0	1	0	0
11000	0	1	0	1	0	0	0
1200	0	2	1	0	0	0	0
1400	0	0	0	0	0	1	0
1500	0	2	1	0	0	0	0
1700	0	1	0	1	0	0	0
1900	0	1	0	0	0	0	0
200	3	1	0	0	0	0	0
2400	0	1	1	0	0	0	0
300	3	0	0	0	0	0	0
3400	0	1	0	0	0	0	0
3500	0	0	0	1	0	0	0
400	2	1	0	0	0	0	0
420	1	0	0	0	0	0	0
450	0	1	0	0	0	0	0
4600	0	0	0	0	1	0	0
500	1	5	1	1	0	0	0
550	1	3	0	0	0	0	0
5500	0	1	0	0	0	0	0
600	1	3	3	1	0	1	0
6100	0	0	1	0	0	0	0
650	0	1	0	0	0	0	0
700	0	4	1	0	2	1	0
7000	0	1	0	0	0	0	0
750	0	0	0	1	0	0	0
800	1	5	1	2	1	1	0
820	0	0	0	0	0	1	0
8500	0	1	0	0	0	0	0
860	0	0	1	0	0	0	0
900	1	1	0	0	0	0	0
950	0	0	0	0	1	0	0
Total	15	40	11	9	7	5	15

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mantarlar tarafından üretilen mikotoksinler, insan tüketimi için belirlenmiş tahılların %25'ini kirletir; Bunlardan aflatoksinler en zehirli türler arasındadır (Wild ve Turner, 2002). Mısır, fındık, pirinç, yer fıstığı, ağaç yemişleri, incir, zencefil, küçük hindistan cevizi ve sütü kontamine ettiği bilinen *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* karaciğer için kanserojen olan aflatoksinler üretirler (Ellis ve diğerleri, 1991). Aflatoksinler, bazı *Aspergillus* türleri tarafından sentezlenen düşük moleküler ağırlıklı ikincil metabolitlerdir. Dört ana aflatoksin, aflatoksin B1 (en kanserojen), aflatoksin B2, aflatoksin G1 ve aflatoksin G2'dir ve tavşanlarda 0,3 mg/kg BW(Body weight) ile 18 mg/kg BW arasında değişen yarı maksimum öldürücü doz (LD₅₀) değerlerine sahiptir. (Moss, 1998; IARC, İnsanlara Karsinogenik Risklerin Değerlendirilmesi Çalışma Grubu, 2002; FDA (Gıda ve İlaç İdaresi, 2012).

Gıda ve yemlerde aflatoksin oluşumu birçok ülkede sıklıkla rapor edilmektedir. Yapılan araştırmalar; başta kabuklu yemişler, tahıllar, meyveler, sebzeler, otlar ve baharatlar olmak üzere ham tarım ürünlerinin izin verilen maksimum sınırı aşan yüksek seviyelerde aflatoksin B1 ile kirlendiğini göstermiştir (Chen ve diğerleri, 2013; Guchi, 2015; Waliyar ve diğerleri, 2015). Ayrıca peynir, yoğurt ve krema gibi süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M1 kontaminasyonu meydana gelmiş ve süt pastörizasyonundan sonra bile devam etmektedir (Yitbarek ve Tamir, 2013).

Özellikle fındık tüm kabuklu kuruyemiş ürünleri arasında tüketim sıklığı açısından önemli bir yer almaktadır. Fındık, koroner kalp hastalığı ve diyabetin önlenmesi gibi

sağlık yararları olan bir gıda olarak kabul edilmesine rağmen (Hu Fb vd, 2002; Jenkins DJA vd, 2008), sıklıkla AF'lerle kontamine olmaktadır. Birçok Avrupa ülkesi, 26 Şubat 2010 tarihli ve 165 sayılı Avrupa Birliği Komisyon Tüzüğü (AB) ile yemişlerdeki aflatoksin kısıtlamasını oluşturmuştur (Commission Regulation (EU), 2010). Bu düzenleme, AFB1 ve toplam AF'ler (B1, B2, G1 ve G2) için maksimum seviyeleri belirler. Ayrıca yönetmelik, insan tüketiminden önce veya gıda maddelerinde bir bileşen olarak kullanılmadan önce ayıklamaya veya diğer fiziksel işlemlere (örneğin ağartma) tabi tutulan yemişler ile doğrudan insan tüketimine yönelik veya gıda maddelerinde bileşen olarak kullanılması amaçlanan sert kabuklu yemişler arasında ayırım yapmaktadır. Dünya'daki fındık üretiminin %80'inin ve dünyaya ihracatın %70 oranında ülkemizden sağlandığı düşünüldüğünde, halk sağlığı, hayvan sağlığı ve yem üretimi açısından ülkemizde ki fındığın sağlıklı olması önem kazanmaktadır. Dünya çapında hem birim fiyat açısından insan tüketiminde lüks sınıfa girmesi, gıda sanayisinde kullanıldıktan sonra arta kalan kısmının hayvan beslemede sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesi, ekonomik açıdan ciddi katma değer sağlayacaktır. Örneğin 2022 yılında Ordu ilinde fındık zürufundan hayvan yemi üretilmesi ile ilgili gelişmeler bildirilmiştir (Fındık kapsülünden hayvan yemi elde ediliyor KARADENİZ EKONOMİ Karadenizin İlk ve Tek Ekonomi Gazetesi (karadenizekonomi.com.tr). Bunun yanı sıra fındık küspesinin son yıllarda broiler besleme ve balık yemi üretiminde, içinde barındırdığı %50'lik protein oranı ile hayvan canlı ağırlık artışında önemli rol oynaması yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak fındığın açık hava, toprak ve tarladan sofraya kadar yolculuğu süresinde maruz kaldığı çapraz kontaminasyonlar fındığın kalitesinin bozulmasına ve sağlık için bir tehdit oluşmasına yol açacaktır. Hayvan beslemede sağlayacağı önemi tartışırken uygun olmayan şartlara maruz kalan yem ve yem maddelerinden kaynaklı oluşabilecek maya ve küf üremesi özellikle hayvanlardan yem yolu ile alınmış olan aflatoksinlerin insanlara geçişini kolaylaştıran bir yol haline gelebilir.

Aflatoksinin ciddi sağlık sorunlarına yol açabileceği geçmişte yapılan çalışmalardan bilinmektedir. Örneğin, 1960 ilkbahar ve yazından, İngiltere'nin kuzey ve güneyinde gizemli bir hastalığın 100.000'den fazla hindiye öldürdüğüne dair raporlar var. Ördek ve sülünleri de etkileyen bu hastalığa "hindi X hastalığı" adı verildi. Diyet modifikasyonu morbiditeyi mortalite oranına düşürdüğü için bu hastalığın diyetle bağlı olduğu kabul edildi ve etkilenen tüm hayvanların diyetlerinin *Aspergillus flavus*

ve dolayısıyla "aflatoksin" adı verilen toksik maddeyi içeren Brezilya fıstığı ile kontamine olduğu belirlendi (Gözde Girgin, Nurşen Başaran, Gönül Şahin. 2001).

Küfler tarafından üretilen insan ve hayvanlarda toksik etkilere sebep olabilen mikotoksinler özellikle yem sanayisinde karşılaşıldığında iki farklı sebeple karşımıza çıkabilir. Mesela süt veren hayvanların aflatoksin içeren yem maddeleri ile beslenmesi sonucu oluşan metabolitlerin hayvanın sütüne geçmesi suretiyle insanlara aktarımı (aflatoksin B1, aflatoksin M1) ya da direk olarak tüketilecek olan sütün kontaminasyonu sonucu insanlarında bu metabolitlere maruz kalması (Nilüfer ve Boyacıoğlu, 2003). Aflatoksinlerin bütün Dünya’da sebep olduğu ekonomik kayıplar ve sağlık kayıpları konunun önemini daha da arttırmaktadır (Ünlütürk ve Turanta_,1999).

Aflatoksin tüm kümes hayvanlarını etkiler ve yüksek seviyelerde genellikle ölümcül olurken, düşük seviyelerde uzun süreli yutulması zararlı etkilere sahiptir. Yavru kümes hayvanları, özellikle ördekler ve hindiler aflatoksinlere karşı çok hassastır (Ferrer, 2005). Bunu azalan sırayla kaz, sülün, tavuk ve beç tavuğu izlemektedir. Ördeklerin ve hindilerin yüksek duyarlılığı, bunların sitokrom P450 sistemleri tarafından oldukça aktif metabolitlere dönüştürülmesiyle ilgilidir (Kaya ve diğerleri, 2002).

Bu açıdan İtalya’da Diella ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada Dünya genelinde farklı ülkelerden ithal edilmiş ve market tüketimine sunulmuş ürünler aflatoksin kontaminasyonu açısından incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında en çok kontamine olmuş fındıkların Asya’dan gelen örneklerde olduğu görülmüştür. Buna göre kontamine olmuş fındıkların olduğu ülke dağılımları şu şekilde olduğu belirtilmiştir; İran (%26,3), Afganistan (%21,1), Özbekistan (%21,1), Tacikistan (%10,5), Türkiye'den (%10,5), Çin (%5,3) ve Gürcistan (%5,3). Kuzey ve Asya örnekleri analiz edildiğinde, çeşitli alt bölgelerde AF (aflatoksin) kontaminasyonu farklıydı ($p<0.001$). Ayrıca Batı ve Orta Asya arasında kontaminasyon oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir (Diella ve arkadaşları, 2018). Yapılan bu çalışmada Türkiye’nin de dahil olduğu bu ülkelere gelen fındık ürünlerinde kontaminasyon riskinin yüksekliğini göstermesi açısından önemlidir.

Bu çalışmada amaç; Sakarya bölgesinde üretilen çiğ fındıkta aflatoksin varlığının araştırılmasıdır. Fındık üretim ve ihracatında büyük bir pazar payına sahip olan Sakarya bölgesindeki fındık kalitesinin belirlenmesinin insan sağlığı ve ekonomik açıdan büyük bir önem kazanacağı düşünüldü. Bu amaçla Sakarya Ticaret Borsası laboratuvarında, isimsiz ve farklı yerlerden temin edilmiş 102 örnek bu amaçla değerlendirildi. Çalışmamızda elde edilen veriler neticesinde Sakarya yöresinde çiğ fındıkta maya-küf varlığı açısından en sık tespit edilen türün *Penicillium* olduğu belirlendi. Yine, en yüksek koloni üreme ortalamasının *Penicillium* cinsinde olduğu tespit edildi.

Bu çalışma ile; Türkiye genelinde fındık ve benzeri kabuklu yemişler üzerinde aflatoksin kontaminasyon yükünü belirlenmesi adına, Küf ve Maya Sayımı – Koloni Sayımı Tekniği – ISO 21527-2 sonuçlarının değerlendirilmesi ve HPLC yöntemi ile alınan sonuçlar ile mukayese edilmesi adına ilk çalışmadır. Türkiye’de bu açıdan benzer çalışmalar daha çok süt ve süt ürünlerinde ki kontaminasyonun araştırılması üzerinedir. Benzer şekilde, Tekirdağ ve Aydın bölgesinde kuru incir ürünleri üzerinde (Yıkılmaz, F. 2007), Afyon bölgesinde ceviz üzerinde (Taner, E. 2006), İstanbul bölgesinde antep fıstığı (Sedefoğlu, C. 2013) üzerinde aflatoksin tür ve tayin analiz çalışmaları yapılmıştır. Fındık üzerinde daha çok depolama şartlarının Aflatoksinler üzerinde etkisi ya da kurutma yöntemlerinin aflatoksinler üzerinde etkisi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalara özellikle kuru incir üzerindeki aflatoksin insidansının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Yine benzer olarak ceviz ve antepfıstığı ile ilgili çalışma sonuçlarında da sadece belirlenen bir yöntemle aflatoksin varlığının tespit edilmesi yoluna gidilmiştir. Bu çalışmaların genelinde Aflatoksin varlığının saptanması açısından HPLC, TLC gibi daha modern sayılabilecek teknikler kullanılmıştır.

Aflatoksin B1 içeren gıdaları veya yemi dekontamine etmek için birçok fizikokimyasal teknoloji geliştirilmiştir, ancak bunların çoğu güvenlik ve duyu kalitedeki düşüşler ve tatmin edici olmayan uygulanabilirlik açısından pratiklik içermez. Ayrıca bu işlemler gıda özelliklerinde istenmeyen değişikliklere neden olur. Gıda ve yemdeki toksin üretimini en aza indirmek ve mikotoksinleri ortamdan uzaklaştırmak için fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler tavsiye edilmiştir. (Faucet-Marquis ve ark., 2014). Fiziksel işlemler olarak adsorbanlar yaygın olarak kullanılmaktadır ancak etkinlikleri adsorbanın kimyasal yapısına bağlıdır (Kabak vd.,

2006; Di Natale vd., 2009). Bu nedenle gıdalarda aflatoksin B1 kontaminasyonunu önlemek için tarımsal uygulamalar ve saklama koşullarının iyileştirilmesi gerekmektedir (Wu ve ark., 2009).

Fındık üzerinde aflatoksin gelişim koşulları açısından yapılan çalışmalarda ürünün depolanma koşullarındaki havanın bağıl nem oranının %85 ve danelerdeki nem oranının %18 üstünde olması halinde, ürünün düşük sıcaklık derecelerinde depolanmaması halinde fındıkta en fazla üremenin *Penicillium* cinsinde olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle tarım ürünlerinin tarladan sofraya gelinceye kadar karşılaşacağı kontaminasyon alanlarının minimize edilmesi hem halk hemde hayvan sağlığı açısından önem arz etmektedir. Fındık için aflatoksin gelişiminin minimize edilmesi için hasat zamanı ve hasat öncesinde bahçelerin düzenli bakımlarının yapılması, endüstriyel kurutma ve işleme koşullarının sağlanması gerekmektedir.

Genel olarak analiz yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmalar literatür bazında oldukça sınırlıdır. Yapılan bu çalışmada HPLC yöntemi alınan sonuçların belirlenen limitlerin altında kalıp negatif olarak değerlendirilirken, klasik besiyeri tekniğinde örneklerin %74'ünde üreme tespit edilmiştir. Saklama koşullarının uygun olması ürünlerin tazeliğini muhafaza etmesi ile HPLC cihazı ile yapılan analizlerde gıda kodeksine göre Aflatoksin limitlerini aşan değerlere rastlanılmadığı görülmüştür. Bilindiği üzere HPLC metodu Aflatoksinlerin belirlenmesinde dünyada en yaygın kullanılan ve bu anlamda altın standart olarak bilinen bir yöntemdir. Depolama şartları uygun olduğunda ve kontaminasyon sonucu ürünlerin barındırdığı küfler ve mayalar varlıklarını ortaya çıkaramamaktadır. Ancak bu onların var olmadığı anlamına gelmez Biz yaptığımız bu çalışmada klasik besiyeri ekim metodunu kullanarak aslında çapraz bir sorgulama yapmak istedik. Ve bu sorgulamada gördük ki Sakarya'da en önemli ve katma değeri en yüksek tarım ürünlerinden biri olan fındık üretiminde kontaminasyon seviyemiz hala oldukça yüksek, özellikle fındık hasatının yapıldığı dönemlerde yapılan gözlemler şunu göstermektedir ki tarladan sofraya gelinceye kadar fındık hala endüstriyel yöntemlerden çok uzak bir şekilde toplanmaktadır. Bunun sonrasında ki kurutma kırılma ve ağartma işlemleride tam anlamıyla endüstriyelleşememiştir. Bu da bizlere maruz kaldığı kontaminasyonun nedeni yüksek olduğunu göstermiştir.

Fındık işlenmesi esnasında yapılan işlemler: fındığın tarladan elle toplanması, nakliyesi, fındık kapsülünü soyulması, kurutulması, taşınması, kırılması, ağartılması, kavrulması ve depolanması gibi birçok aşamalardan geçmektedir. Bu aşamalar esnasında fındık kontaminasyona uğramakta ve birçok maya ve küf ile kontamine olmaktadır. Bunun yanısıra kontamine olan fındığın uygun koşullarda depolanmaması mevcut maya, küflerin üreyerek toksin üretmesine ve toksin oranlarının artmasına sebep olabilmektedir. Fındığın depolanması ve işlenmesine kadar geçen süreçte önemli olan belirlenmiş kritik kontrol noktalarının gözden kaçırılmadan uygulanmasının sağlandığından emin olunmasıdır. Bu nedenle işlenmesi ve depolanması aşamalarında kontaminasyona sebep olabilecek noktalarda kontrol ve tedbirler ne kadar sık yapılırsa maya küf oranlarının düşürülmesi, toksin varlığının azaltılması için o kadar faydalı olacaktır.

Çalışmada tür tayini için, makroskobik bakıda üreyen kolonilerin olduğu petrinin ön ve arka yüzündeki morfolojisi değerlendirildi. Mikroskobik incelemede, üreyen kolonilerden hazırlanan preparatlar laktofenol pamuk mavisi ile boyandı. Mikroskopik bakıda hifa, makrokonidium ve mikrokonidium yapıları incelendi ve identifiye edildi. İdentifikasyonda, makroskobik ve mikroskobik bakıyı takiben klasik biyokimyasal yöntemlerle beraber moleküler yöntemlerin de kullanılmasının önerilebileceği sonucuna varıldı. Aflatoksin tayininde bütün dünyada kullanılan altın standart olarak bilinen HPLC yöntemi ile yapılan analiz sonuçları değerlendirildi. Toksin miktarı limitleri “Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği”ne göre fındık, mısır ve yerfıstığında Aflatoksin B1 için 5 µg/kg, Toplam Aflatoksin için ise 10 µg/kg’ olmasına karşılık, alınan sonuçlar limitlerin altında olduğu için negatif olarak değerlendirildi. Küf ve Maya Sayımı – Koloni Sayımı Tekniği – ISO 21527-2 kullanarak yapılan klasik besiyeri tekniğinde uygun koşullar sağlandığında kontaminasyona maruz kalan ürünlerin taşıdıkları yükler oranında Aflatoksin üremesine maruz kaldığı görüldü.

Bu tez çalışması hem hayvan sağlığı hemde insan sağlığı açısından tüketime sunulan önemli bir ürün olan fındığın kalitesi ve tazeliğini koruyabilmesi adına işleme ve depolama koşullarının ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu
(AOAC) *Association of Official Agricultural Chemists Official Methods of Analysis* 970/45 www.aoac.org
- Adnan Ünlütürk, F. T. (1998). Gıda Mikrobiyolojisi. *Mengi Tan Basımevi*, İzmir, 605.
- Adnan Ünlütürk, F. T. (1999). Gıda Mikrobiyolojisi. *Mengi Tan Basımevi*, İzmir, 605, 155-156.
- Agag, B. I. (2004). Mycotoxins in foods and feeds: 1-aflatoxins. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res.*, 7(1), 173-205.
- Almond Board Report Summary, (2002), Aflatoxin in Almonds: *Effect of further Processing Summary Report*
- Anonim, (2006). <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210010320.pdf> *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü* 891112005.
- Anonim, (2008). *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ* (Tebliğ no: 2008/26), 16 Şubat 2009 tarih ve 27143 sayılı Resmi Gazete değişikliği).
- Anonim, (2011). *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Yürütme ve İdare Bölümü*, 32 s, (29 Kasım, 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete değişikliği).
- Arda, M. 1975. Mikotoksinler ve Mikotoksikozis, *Veteriner Hekimleri Derneği Dergisi*, 45 (3) : 5-17

- Atik, İ. (2012). *Aydın ilinde doğal olarak kurutulan, geleneksel ve endüstriyel işlenen incirlerin bazı özellikleri ve aflatoksin içerikleri* (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Atlas of Fungal Infections, Ed: C. Kauffmann, 2 nd ed, *Springer*
- Aytaç, S. A. (1983). *Aflatoksinler ve Türkiye’de Aflatoksinler Üzerine Yapılan Çalışmalar*, H.Ü. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Mezuniyet tezi, Ankara.
- Barug, D., Bhatnagar, D., van Egmond, H. P., Van Der Kamp, J. W., Van Osenbruggen, W. A., & Visconti, A. (Eds.). (2006). The mycotoxin factbook: food & feed topics. *Wageningen Academic Publishers*.
- Bayman, P., Baker, J. L., & Mahoney, N. E. (2002). Aspergillus on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*, 155(3), 161-169.
- Beltz, R. M., & Spain, J. N. (1998). Effects and control of aflatoxicosis in dairy cattle. *Journal Animal Science*, 76(1), 380.
- Bennett, J. W., & Papa, K. E. (1988). The aflatoxigenic Aspergillus spp. *Advances in plant pathology: genetics of plant pathogenic fungi*, 6, 263-80.
- Food and Drug Administration. (2012). Natural toxins: aflatoxins. *Bad bug book, foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins*, 2nd edn. FDA, Silver Spring.
- Chiou, R. Y., Koehler, P. E., & Beuchat, L. R. (1984). Hygroscopic characteristics of peanut components and their influence on growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus. *Journal of food protection*, 47(10), 791-794.
- Campbell, B. C., Molyneux, R. J., & Schatzki, T. F. (2003). Current research on reducing pre-and post-harvest aflatoxin contamination of US almond, pistachio, and walnut. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 22(2-3), 225-266.
- Charles, R., & Hurburg, J. R. (1995). Mycotoxins in the grain market. *World Grain*, 26-33.
- Chen, Y. C., Liao, C. D., Lin, H. Y., Chiueh, L. C., & Shih, D. Y. C. (2013). Survey of aflatoxin contamination in peanut products in Taiwan from 1997 to 2011. *Journal of Food and Drug Analysis*, 21(3), 247-252.

- Ciegler, A., S. Kadis & S. J. Ajl (eds.) (1971) Fungal toxins. In 'Microbial Toxins', Vol. Vi, 563 pp. Academic Press, New York.
- Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 127(1-3), 19-28.
- D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman (2005). "Principles of Instrumental Analysis," 5th Edition, Thomson Asia Pte Ltd., Singapore City, Çev. Bilim Yay. Böl. 28 s. 732
- Demir, C., Simsek, O., & Hamzaçebi, H. (2002). Fındıkta küf florası ve aflatoksin oluşumunun araştırılması. *Gıda*, 27(4).
- Denizel, T., Jarvis, B., & Rolfe, E. J. (1976). A field survey of pistachio (*Pistacia vera*) nut production and storage in Turkey with particular reference to aflatoxin contamination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27(11), 1021-1026.
- Denizel, T., Rolfe, E. J., & Jarvis, B. (1976). Moisture-equilibrium relative humidity relationships in pistachio nuts with particular regard to control of aflatoxin formation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27(11), 1027-1034.
- Denizel, T. (1979). *Mısırların depolanması sırasında oluşan bazı mikotoksinler ve bunların sinerjetik etkileri üzerinde araştırmalar*. Doçentlik Tezi, Ankara.
- Diella, G., Caggiano, G., Ferrieri, F., Ventrella, A., Palma, M., Napoli, C., ... & Montagna, M. T. (2018). Aflatoxin contamination in nuts marketed in Italy: Preliminary results. *Ann Ig*, 30(5), 401-9.
- Di Natale, F., Gallo, M., & Nigro, R. (2009). Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 186-191.
- Doğan, G., & Bircan, R. (2010). Balık yemlerinde alternatif bitkisel protein kaynağı olarak fındık küspesi kullanımı. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 49-57.
- Dwayne, J., Ph.D. Thrasher, (2005). *Poison of The Month. Aflatoxins and Aflatoxicosis*, http://www.drthrasher.org/Aflatoxins_and_Aflatoxicosis. Erişim tarihi: 12-07-2005
- Eaton, D. L., & Groopman, J. D. (Eds.). (2013). *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Elsevier.

- European Commission. (2010). Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Off. J. Eur. Union*, 50, 8-12.
- Faucet-Marquis, V., Joannis-Cassan, C., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2014). Development of an in vitro method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: Case of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(17), 7583-7596.
- Ferrer, E.J. (2005). Effects of Mycotoxins (*Aflatoxin B1*, *deoxynivalenol*, *zearalenone*, *vomitoxin T-2*) on the Health and Productivity of Specific Production Animals
- Food and Drug Administration. (2012). Natural toxins: aflatoxins. *Bad bug book, foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins, 2nd edn. FDA, Silver Spring*.
- Harvey, R. B., Phillips, T. D., Ellis, J. A., Kubena, L. F., Huff, W. E., & Petersen, H. D. (1991). Effects on aflatoxin M1 residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows. *American journal of veterinary research*, 52(9), 1556-1559.
- Heatcote, J. G. (1984). The Physical and Chemical Properties. 98-111 s, Vlademir, B.(Ed). *Mycotoxins*.
- Gilbert, J., & Anklam, E. (2002). Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(6-7), 468-486.
- Girgin, G., Başaran, N., & Şahin, G. (2001). Mycotoxins in turkey and the world. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 58(3), 97-118.
- Gizachew, D., Szonyi, B., Tegegne, A., Hanson, J., & Grace, D. (2016). Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food control*, 59, 773-779.
- Guchi, E. (2015). Implication of aflatoxin contamination in agricultural products. *American Journal of Food and Nutrition*, 3(1), 12-20.
- Gündüz, T., (2002). İnrümentel Analiz 6. Baskı *Ankara Gazi Kitabevi* s.441

- Günşen, U., ve Büyükyörük, İ. (2003). Piyasadan temin edilen taze kaşar peynirlerinin bakteriyolojik kaliteleri ile aflatoksin M1 düzeylerinin belirlenmesi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(4), 821-825.
- Gürses, M., Erdoğan, A., & Çetin, B. (2004). Occurrence of aflatoxin M₁ in some cheese types sold in erzurum, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 28(3), 527-530.
- Hu, F. B., & Willett, W. C. (2002). Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *Jama*, 288(20), 2569-2578.
- İnal, T. (1990). Süt ve süt ürünleri hijyen ve teknolojisi. *İstanbul: Final Ofset*, 1044-1045
- İnal, T. (1992). Besin hijyeni: Hayvansal gıdaların sağlık kontrolü (2. baskı.). *İstanbul: Final Ofset*, 251-252
- Jenkins, D. J., Hu, F. B., Tapsell, L. C., Josse, A. R., & Kendall, C. W. (2008). Possible benefit of nuts in type 2 diabetes. *The Journal of nutrition*, 138(9), 1752S-1756S.
- Kabak, B., Dobson, A. D., & Var, I. I. L. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(8), 593-619.
- Kabak, B. (2016). Aflatoxins in hazelnuts and dried figs: Occurrence and exposure assessment. *Food Chemistry*, 211, 8-16.
- Karadeniz Haber. (2022, 10, 07). Karadeniz Haber web sitesi: <https://www.karadenizekonomi.com.tr/gundem-haberleri/findik-kapsulunden-hayvan-yemi-elde-ediliyor/18153/detay>
- Kaya, S., Pirinçci, İ., & Bilgili, A. (2001). Mikotoksinler, Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. *Medisan Yayınevi*, Ankara.
- Konca R., Gülseri O., (1990). Ultraviyole Lambanın Aflatoksinli İncirlerin Ayrılmasındaki Fonksiyonunun Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar
- Kök, Z. (2006). *Aydın ili ve çevresinde üretilen süt ve süt ürünlerinde aflatoksin varlığının araştırılması* (Doctoral dissertation, Adnan Menderes Üniversitesi).
- Leontopoulos, D., Sifaka, A., & Markaki, P. (2003). Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. *Food Microbiology*, 20(1), 119-126.

- Lopez, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L., & Perez, J. (2001). Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International journal of food microbiology*, 64(1-2), 211-215.
- Magan, N., & Olsen, M. (Eds.). (2004). Mycotoxins in food: detection and control. *Woodhead Publishing*.
- Mikrobiyoloji Org (2022). *Maya ve küf tayini belirleme yöntemleri*. <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/942121011.pdf>/ İndirilme tarihi: 01.11.2022
- Moss, M. O. (1998). Recent studies of mycotoxins. In *Symposium series (Society for Applied Microbiology)* (Vol. 27, pp. 62S-76S).
- Moss, M. O. (2002). Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(3-4), 137-142.
- Nilüfer, D., & Boyacıoğlu, D. (2003). Süt ve süt ürünlerinde mikotoksin riski ve analizi. *SEYES Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu Bildiriler Kitabı*, 22, 23.
- Northolt, M. D., Verhulsdonk, C. A. H., SOENTORO, P. S. S., & Paulsch, W. E. (1976). Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of milk and food technology*, 39(3), 170-174.
- Ozay, G., Seyhan, F., Pembeci, C., Saklar, S., & Yilmaz, A. (2008). Factors influencing fungal and aflatoxin levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage: A 3-year study. *Food Additives and Contaminants*, 25(2), 209-218.
- Özmenteşe, N. (2002). *İstanbul piyasasından sağlanan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin B1 ve M1 içerikleri yönünden yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile araştırılması* (Doctoral dissertation, Marmara Üniversitesi (Turkey)).
- Papp, E., H-Otta, K., Záray, G., & Mincsovcics, E. (2002). Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchemical Journal*, 73, 39-46.
- Pickova, D., Ostry, V., Toman, J., & Malir, F. (2021). Aflatoxins: History, significant milestones, recent data on their toxicity and ways to mitigation. *Toxins*, 13(6), 399.

- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: An update review. *Revue de Medecine Veterinaire (France)*.
- Quillien, J. F. (2002). *Mycotoxins*. Institut National de la Recherche Agronomique.
- Sabuncuoğlu, S. A., Baydar, T., Giray, B., & Şahin, G. (2008). Mikotoksinler: Toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (1), 63-92.
- Sakai, T., Sugihara, K. ve Kozuka, H., (1984), "Growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* in plant materials", *Journal of Hygienic Chemistry*, 30:62–68.
- Schatzki, T.F. ve Pan J.L., (1996), "Distribution of aflatoxin in pistachios. 3. Distribution in pistachio process streams", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44: 1076-1084.
- Schatzki, T.F.ve Pan J.L., (1997), "Distribution of aflatoxin in pistachios. 4. Distribution in small pistachios", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45:205–207.
- Schatzki, T.F., (2001), "Ong MS. Dependence of aflatoxin in almonds on the type and amount of insect damage", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4513–4519
- Schuster, R., & Schulenberg-Schell, H. (2000). A new approach to lower limits of detection and easy spectral analysis. Fluorescence detection in liquid chromatography). *Agilent technologies*.
- Sedefoğlu, C. (2013). *Antep fıstıklarında okratoksin A ve aflatoksin varlığının incelenmesi* (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Sert, S., (1985). Mikotoksinlerin Üretimine Etki Eden Faktörler. *Atatürk Üniv. Zir. Fak. Derg.*, 1-4 (16), 147-149
- Seyrek, K. (2001). Türk Silahlı Kuvvetlerine bağlı birliklerde tüketilen beyaz peynirlerdeki aflatoksin M1 seviyesinin ELISA metodu ile saptanması. *Vet Hek Dern Derg*, 72, 55-58.
- Stroka, J., & Anklam, E. (2000). Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography. *Journal of chromatography. A*, 904(2), 263–268. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00947-x)

- Stubblefield, R. D., & Shannon, G. M. (1974). Collaborative study of methods for the determination and chemical confirmation of aflatoxin M1 in dairy products. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 57(4), 852–857.
- Şen, L., & Nas, S. (2010). Fındık ve antep fıstığının mikotoksin problemi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1), 49-56.
- Taner, E. (2006). *Afyonkarahisar ilinde tüketilen cevizlerin aflatoksin içeriği açısından incelenmesi* (Master's thesis).
- Tiryaki, O. , Seçer, E. & Temur, C. (2011). Yemlerde Mikotoksin Oluşumu, Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri . *ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi* , 21 (1) , 44-58 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/anadolu/issue/1758/21721>
- Tosun, N., (1996). İncir Meyvelerinde Aspergillus Flavus Grubu Fungusların Kimyasal Yöntemlerle Önlenmesi Yoluyla Aflatoksinlerin Azaltılma Olanakları Üzerinde Araştırmalar. *Ege Üniversitesi Fen Bil. Ens.*
- Tunail, N. (2000). Funguslar ve Mikotoksinler, ikinci Baskı. Editör, Tunail, N. *Medisan Yayınevi*, 4-34.
- Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği, (2011/12/17). *tarihli ve 28145 sayılı Resmî Gazete.*
- Uylaşer, V. ve Başoğlu, F. (1992). "Gıda zehirlenmelerinde etkin olan mikroorganizmalar". *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(1), 261-273.
- Van Egmond H. P. (1989). Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food additives and contaminants*, 6(2), 139–188. <https://doi.org/10.1080/02652038909373773>
- Van Egmond, H.P. & Jonker, M.A. 2004. Worldwide regulations on aflatoxins- the situation in 2004. *Journal of Toxicology: Toxin Review*, 23: 273–293, DOI: 10.1081/TXR-200027844
- Verma, R. J. (2004). Aflatoxin cause DNA damage. *International Journal of Human Genetics*, 4(4), 231-236.
- Vicam L.P, (1999). Fluorometer procedure for corn gluten meal and corn gluten feed USDA-FGIS Method, *Aflatest Instruction Manual* s:40
- Vural, N. (1992). Eczacılık Fakültesi Besin Analizleri. *Yayın no: 69*. 137

- Waliyar, F., Osiru, M., Ntare, B. R., Kumar, K., Sudini, H., Traore, A., & Diarra, B. (2015). Post-harvest management of aflatoxin contamination in groundnut. *World Mycotoxin Journal*, 8(2), 245-252.
- Wild, C. P., & Turner, P. C. (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17(6), 471–481. <https://doi.org/10.1093/mutage/17.6.471>
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*, 80(5), 1106–1122. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106>
- Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., & Kuca, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug metabolism reviews*, 41(1), 1–7. <https://doi.org/10.1080/03602530802563850>
- Yıkılmaz, F. (2007). *Tekirdağ ilinde satışı sunulan kuru incirlerde aflatoksin varlığı* (Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi).
- Yiannikouris, A., & Jouany, J.P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51, 81-99.
- Yitbarek, M.B., & Tamir, B. (2013). Mycotoxines and/or Aflatoxines in Milk and Milk Products: Review. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 4, 1-32.
- Zafar, A., Jabeen, K., & Farooqi, J. (2017). Practical guide and atlas for the diagnosis of fungal infections.

EK-1. İNTİHAL RAPORU

**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**

İNTİHAL RAPORU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Murat YILDIRIM danışmanlığında sunulan “SAKARYA İLİ VE ÇEVRESİNDE ÇİĞ NATUREL FINDIKLARDA MAYA, KÜF TESPİTİ VE HPLC YÖNTEMİ İLE AFLATOKSİN TİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Orjinallik Raporu	Tezin Benzerlik İndeksi (%)
Toplam Benzerlik İndeksi	%15
İnternet Kaynakları	%15
Yayınlar	%2
Öğrenci Ödevleri	%0

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 04/01/2023

Samet KORKMAZ

Prof.Dr. Murat YILDIRIM